UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1961-1962 N° 821

ACTIVITÉ LIPASIQUE DES MYCOBACTÉRIES VIRULENTES ET AVIRULENTES

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 22 février 1962
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

STELIO PATOCCHI
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY, Professeur, Président
Ch. LAPP, Professeur
J. MEYER, Maître de Conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1962

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG - FACULTÉ DE PHARMACIE

Année scolaire 1961-1962 Nº 821

ACTIVITÉ LIPASIQUE DES MYCOBACTÉRIES VIRULENTES ET AVIRULENTES

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 22 février 1962
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

STELIO PATOCCHI
Pharmacien

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Examinateurs de la Thèse { MM. R. SARTORY, Professeur, Président
Ch. LAPP, Professeur
J. MEYER, Maître de Conférences } Juges

IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1962

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION :

MM. N., *Doyen*
GAZET DU CHATELIER, *Assesseur*, I. ✪
CLADY, *Secrétaire*, I. ✪

PROFESSEURS :

MM.	LAPP, ❋, I. ✪	Physique
	SARTORY, O. ❋, I. ✪, O. ✪	Bactériologie
	CORDIER, ❋, I. ✪	Pharmacie chimique
	DUQUÉNOIS, ❋, I. ✪, ✪	Matière médicale
	JAEGER, I. ✪, ✪	Botanique
	GAZET DU CHATELIER, I, ✪	Pharmacie galénique
	HASSELMANN, I. ✪	Chimie analytique
	SCHREIBER, I. ✪	Chimie organique
	EBEL, ❋, ✪, I. ✪	Chimie biologique

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM.	LEDOUX, ✪, ✪	Sciences naturelles
	MÉTAIS	Sciences appliquées
	MALGRAS	Sciences naturelles
	LAUSTRIAT	Sciences physico-chimiques

MAITRE DE CONFÉRENCES HONORAIRE :
M. COLLARD

COURS COMPLÉMENTAIRES :

MM.	LAPP	Acoustique
	SARTORY	Cryptogamie
	CORDIER	Éléments de chimie organique
	DUQUÉNOIS	Hydrologie
	GAZET DU CHATELIER	Pharmacodynamie
	HASSELMANN	Chimie minérale
	SCHREIBER	Chimie générale
	EBEL	Biochimie analyt. et séméiolog.
	LAVIGNE	Législation et Déontologie pharmaceutiques
	LEDOUX	Bactériologie pharm. et techn.
	MALGRAS	Sérologie
	LAUSTRIAT	Minéralogie et Éléments de mathématiques
	C. MEYER	Comptabilité et fiscalité pharmaceutiques

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES :

Mme	KRISTENSEN		Chimie pharmaceutique
MM.	MATHIS		Chimie
	CARBIENER		Histoire naturelle
	STAHL	(charges des fonctions)	Bactériologie et Parasitologie
	C. F. LAPP		Chimie et Physique
	ROMOND		Bactériologie

Au Président du Jury de ma Thèse,

Monsieur R. SARTORY

Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

A mes Juges,

Monsieur Ch. LAPP

Professeur de Physique
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Monsieur J. MEYER

Ancien Maître de Conférences d'Hygiène et de Microbiologie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

Hommage de sincère reconnaissance.

A mes Parents,

en témoignage de reconnaissance et d'amour filial.

A ma Femme,

avec toute mon affection.

INTRODUCTION

On peut classer les *ferments* en deux groupes principaux, selon la nature de la réaction qu'ils influencent : le groupe des *hydrolases* et celui des *desmolases*.

Aux premières appartiennent les enzymes capables de scinder la liaison : .. C — O.. et .. C— N.., tandis que parmi les deuxièmes figurent les ferments capables d'ouvrir la liaison : .. C — C ...

L'action des *hydrolases*, comme le nom l'indique, se déploie par l'introduction dans le substrat enzymatique d'une ou plusieurs molécules d'eau à des endroits bien déterminés. Par contre, l'action des *desmolases* se produit en même temps que des réactions libérant le maximum d'énergie et à ce groupe appartiennent *tous les ferments réglant les processus d'oxydation biologique*.

Les lipases appartiennent au groupe des hydrolases et leur activité catalyse non pas l'hydrolyse de tous les lipides en général, mais bien celle d'un groupe particulier, *celui des glycérides*.

On désigne par le terme de glycérides les esters constitués par le glycérol et d'acides gras supérieurs, à savoir : *acide laurique*, *myristique*, *palmitique*, *stéarique*, *arachidique*, parmi ceux à chaîne saturée; et *acide oléique*, *ricinoléique*, *linoléique*, *linolénique* parmi ceux à chaîne non saturée, pour ne citer que les plus importants. Pour d'autres et plus amples généralités sur les lipases et la classification des ferments lipolytiques d'après leur origine, nous renvoyons à la thèse de Schaer (1). Nous voulons cependant insister sur l'importance comme *activateurs enzymatiques*, du *taurocholate de sodium et du chlorure de calcium*, études qui ont été effectuées par J. et G. Clément (2).

Schaer, dans l'historique de son travail, présente aussi un large aperçu sur les différentes *méthodes peu récentes de dosage des ferments lipolytiques*, sur lesquelles nous ne voudrions pas revenir dans l'exposé de nos travaux.

Ceux-ci ont trait aux *lipases des Bacilles tuberculeux*, qui se caractérisent par une très forte richesse en substance lipoïdique susceptible d'atteindre 30 % et plus de leur poids sec, contre 5 à 8 % pour les germes non acido-résistants.

En 1893 Ostwald a définitivement prouvé par ses travaux l'*action catalytique des ferments* et la réversibilité de leur activité qui est *synthétisante* ou *dégradante*. Castle et Lœwenhart ont réalisé, en 1900, la

synthèse enzymatique du butyrate d'éthyle à partir de l'acide butyrique et de l'alcool éthylique sous l'action de la lipase pancréatique.

L'étude des *enzymes lipolytiques* a ensuite fait de rapides progrès; citons pour mémoire les travaux de WILLSTAETTER et MEMMEN, RONA et AMMON, BODENSTEIN et DIETZ, qui ont tous grandement contribué à approfondir nos connaissances sur la *formation* et la *dégradation* des graisses et des lipides en général.

Pour le dosage de ces *enzymes lipolytiques* on a eu recours pendant très longtemps à des *méthodes titrimétriques ou stalagmométriques*. Nous n'insistons pas sur la classification des enzymes en général et des *hydrolases* en particulier, nous contentant de rappeler que dans ce dernier groupe on trouve les *estérases et les lipases*, qui ont fait l'objet d'un certain nombre d'études dans le *Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg;* ces travaux ont prouvé indubitablement la *différence existant entre les estérases*, agissant principalement sur des substrats lipidiques à molécule simple, et *les lipases proprement dites* qui attaquent et synthétisent surtout des graisses à acides gras supérieurs, alors que pendant très longtemps on confondait ces deux espèces d'enzymes sous le terme général de lipases.

Qu'il nous soit permis, avant d'entrer dans le vif de notre sujet, de remercier ici Monsieur R. SARTORY, *Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg;* après nous avoir aimablement accueilli dans son laboratoire, il nous fait le très grand honneur de présider notre Jury de thèse.

Nous remercions également Monsieur Ch. LAPP, *Professeur de Physique à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*, pour la gentillesse avec laquelle il a accepté de siéger dans ce jury.

Toute notre reconnaissance est acquise à Monsieur J. MEYER, *ancien Maître de Conférences d'Hygiène et de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg*. Après avoir été l'instigateur de ce travail, il nous a toujours conseillé et soutenu au cours de son élaboration, nous facilitant la tâche dans la mesure du possible.

Nous donnons ici également une pensée reconnaissante à Monsieur J. MALGRAS, *Maître de Conférence de Sciences Naturelles à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg* pour l'aide qu'il n'a pas manqué de nous accorder chaque fois que nous la lui demandions.

PLAN DE TRAVAIL

Dans le cadre de notre sujet portant sur l'activité lipasique des *Mycobactéries virulentes et avirulentes*, nous relatons dans le *premier chapitre* les généralités concernant l'étude des lipases *élaborées* par *les bactéries acido-alcoolo-résistantes et les autres germes aérobies et anaérobies*. Nous envisageons d'autre part les techniques élaborées au cours des années pour mesurer cette activité estérasique et lipasique.

Nos travaux personnels sont exposés dans trois chapitres, dont le premier a trait à la description de nos méthodes de dosage et au montage des appareils utilisés.

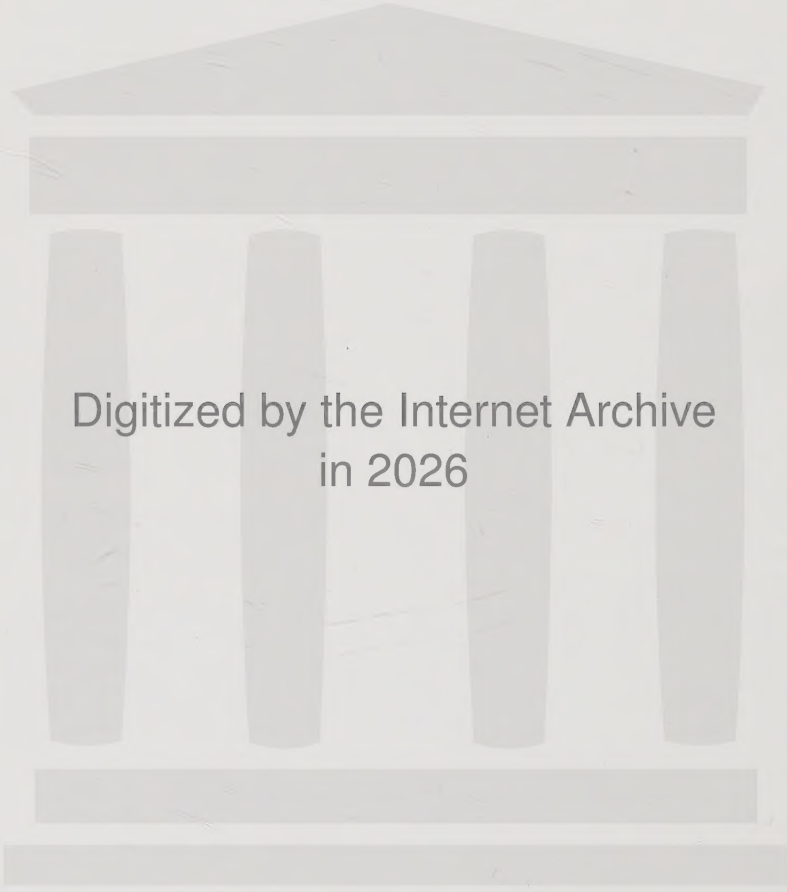
Dans le chapitre III, nous relatons nos essais préliminaires devant démontrer l'existence de lipases lipo- et hydrosolubles chez les germes acido-alcoolo-résistants.

Le chapitre IV est réservé à nos essais d'isolement et de purification des *lipases hydrophiles*. A ce sujet, nous serons obligé d'avoir recours à des méthodes chromatographiques en colonne sur Cellulose DEAE; ce réactif a été séléctionné parmi un grand nombre d'absorbants au cours de nos travaux avec VILLIGER.

D'autre part, nous décrivons nos essais pour trouver *le meilleur solvant aqueux des complexes lipasiques* et la technique d'élution de ces enzymes absorbés sur la cellulose DEAE.

Finalement, nous comparons les différents complexes lipolytiques purifiés que nous extrayons de trois souches acido-alcoolo-résistantes virulentes et de trois souches avirulentes. Comme substrat réactionnel spécifique, nous employons le butyrate d'éthyle, les Tweens 20, 60 et 80, l'huile d'olive et les lipides homologues et hétérologues extrait des souches en étude.

Les Conclusions générales terminent notre exposé.


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548001_0023

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

LE POUVOIR LIPOLYTIQUE CHEZ LES BACTÉRIES

Au cours de notre travail, nous avons tenu *à différencier les estérases des lipases proprement dites*. En effet, l'ancienne conception, employant sans discrimination ces deux termes pour deux groupes d'enzymes nettement différenciées actuellement par leur propriété de dégrader spécifiquement des produits lipidiques de caractères constitutifs indubitablement individualisés et dissemblables, est devenue caduque. Elle avait pour point de départ les travaux de Bamann et Myrbäck (3), de Willstaetter et Memmen (4).

Les *enzymes lipolytiques microbiennes* semblent se rattacher par leurs propriétés chimiques aux *zooferments*; comme pour ces derniers, leur action est *réversible*, c'est-à-dire que selon les conditions expérimentales, *elles peuvent réaliser des réactions de synthèse ou d'hydrolyse*. Il existe cependant une différence importante entre les *lipases des animaux et celles des bactéries acido-alcoolo-résistantes, car ces dernières sont capables d'engendrer des antilipases*, comme J. Meyer (5) l'a démontré.

Un grand nombre d'auteurs ont en effet, essayé de provoquer la formation d'*antiferments contre les zooferments idiogènes*, mais leurs résultats ont été négatifs jusqu'à présent, *et l'on n'a pas réussi à mettre en évidence des anti-estérases hépatiques ou des antilipases pancréatiques, par exemple*.

La possibilité d'engendrer des *antilipases* au moyen d'une lipase microbienne semble donc un premier argument de différenciation. Un autre fait, beaucoup plus caractéristique pour la séparation des *lipases-des bactéries AAR* et des *zoolipases*, a été mis en évidence par J. Meyer et Marti (6) : *la libération des premières au moyen des solvants lipidiques*. Nous aurons l'occasion de revenir sur ce problème, en nous référant aux récents travaux de Villiger (7).

Quant aux *ferments bactériens lipolytiques en général*, nous tenons encore à citer les travaux de Gorbach et Günthner (8), qui ont étudié

la dégradation de l'huile d'olive par des Levures, ainsi que ceux de Willstaetter et Kumagawa (9) concernant la *Taka-enzyme*. Michaelis et Nakahara (10) ont ensuite prouvé que l'optimum de pH pour ces ferments microbiens est situé entre 7,2 et 9,0. Ces faits ont été confirmés par Schaer, en ce qui concerne les *bactéries AAR* et par Arnold (11) pour *certaines lipases fongiques*. Kirsh (12) a prouvé que des extraits de *Penicillium oxalicum* peuvent décomposer à proportions sensiblement égales, des esters de monobutyrate, des triglycérides ainsi que des huiles émulsionnées. Cette observation devrait cependant être revisée, puisque cet auteur avait très probablement affaire à un *complexe lipolytique*. Plus récemment, la question de l'activité lipasique a été envisagée par Richou et son école (13) *en ce qui concerne certaines bactéries pyogènes*. Krœhne (14) a profité de ces travaux, en employant les mêmes substrats spécifiques : *jaune d'œuf, lécithine et huile d'olive*, pour améliorer les techniques de dosage des lipases.

D'autre part, Sebald et Prévot (15) ont effectué des *études qualitatives et quantitatives* du pouvoir lipolytique d'un grand nombre de souches de *Clostridium anaérobies*. Ils écrivent à ce sujet :

« *Le rôle considérable que jouent les bactéries anaérobies lipidolytiques du sol dans la synthèse des pétroles est connu depuis longtemps. Cependant, les données concernant les lipases des anaérobies sont encore fragmentaires. Ceci tient essentiellement à la difficulté de leur mise en évidence : la plupart des méthodes de détection des lipases mises au point pour les aérobies sont difficilement applicables aux anaérobies, surtout si l'on désire les mettre en évidence à partir de bactéries proliférantes. Plusieurs méthodes ont été essayées : l'inclusion de graisse à un milieu gélosé, méthode de* Eijkmann (16), *avait été appliquée aux anaérobies par* Söhngen (17); *les résultats obtenus ont par la suite été controversés. L'addition de colorants au milieu de culture est inutilisable pour les anaérobies, en raison de leurs propriétés réductrices* [German (18)]. *Signalons que l'emploi de rouge neutre basique d'après la méthode de* Knaysi (19) *a cependant permis à* Rosenfeld (20) *de détecter l'activité lipolytique de bactéries anaérobies présentes dans des sables bitumeux, asphaltes, roches pétrolifères et boues marines, et à* Rosenfeld et Zobell (21) *d'étudier la lipase de Sporovibrio desulfuricans. Une méthode acidimétrique n'est pas d'avantage applicable aux anaérobies, en raison de leur production d'acides volatils, même en l'absence de glucides. C'est cependant par cette méthode que* Neill *et* Fleming (22) *ont mis en évidence l'existence d'une lipase active sur la tributyrine chez Clostridium botulinum A et Welschia perfringens. S'adressant à une technique stalagmométrique de* Michaelis *et* Nakahara, German *a pu étudier la lipase de Welschia perfringens et de Clostridium sporogenes. Cette technique très précise n'est malheureusement applicable qu'à des bactéries non proliférantes et ne permet pas de sélectionner des bactéries lipidolytiques à partir d'un prélèvement.*

« *Un progrès considérable a été apporté dans l'étude de cette fonction grâce à l'utilisation des Tweens, substances hydro- et liposolubles, qui sont des polyesters du sorbitol et d'acide palmitique* (*Tween* 40) *stéarique*

(*Tween* 60) *ou oléique* (*Tween* 80). *D'abord utilisés pour la mise en évidence des lipases sur matériel bactérien tué, ils peuvent, selon la technique de* Sierra (23) *être incorporés directement au milieu de culture. En présence de chlorure de calcium, l'acide gras libéré par la lipase est transformé en son sel de calcium insoluble qui précipite sous forme de cristaux, de morphologie spécifique pour chacun de ces sels. L'ensemble des cristaux forme autour d'une colonie lipidolytique un halo visible macroscopiquement. Chaque espèce microbienne lipidolytique possède une spécificité enzymatique rigoureuse lui permettant d'attaquer un ou plusieurs Tweens* ».

Ces auteurs ont mis au point une technique de contrôle du pouvoir lipasique ayant recours à deux milieux :

1) *par culture des germes* sur milieu de Sierra ;

2) *par diffusion sur ce même milieu*, de filtrats acellulaires.

Notons que le *milieu de Sierra* a la composition suivante :

Peptone	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Chlorure de calcium	0,1 g
Eau distillé	1 000,0 cc

On ajuste à pH = 7,4, puis on ajoute :

Gélose	12,0 g

On précipite à l'autoclave à 120° et on filtre. Le *Tween* est ajouté à la concentration finale de 0,5 %, puis on répartit à raison de 4,5 cc dans des tubes de 8 à 9 mm de diamètre et on stérilise pendant 30 minutes à 110°.

Les auteurs ont pu ainsi étudier la formation de lipases constitutives endocellulaire ou diffusibles extracellulaires. Richou et ses élèves ont employé une méthode différente se référant à la méthode de l'*Oxford-cup* utilisée pour le dosage des antibiotiques. Il s'agit donc d'une méthode de diffusion en gélose et boîtes de Pétri. Comme milieu de culture, ils ont recours à la *gélose de Mac Lund modifiée par* Kolmer. Ils introduisent dans ce milieu le substrat spécifique, soit le jaune d'œuf, soit la lécithine, la caséine, l'huile de maïs, additionné de *bleu de Nil* comme indicateur de pH.

En ce qui concerne les *Mycobactéries à activité lipasique*, nous voudrions encore mentionner les récents travaux de Andrejew, Gernez-Rieux et Tacquet (24) qui rapportent que Carrière (25) a pour la première fois mis en évidence en 1901 une *estérase* dans une culture de Bacilles tuberculeux. Certains auteurs ont confirmé depuis cette activité et l'ont étudiée en présence d'autres substrats. Cependant, avant l'introduction des Tweens par Gomori (26) et Archibald (27), on a employé comme substrat soit *une huile insoluble dans l'eau*, telle que

l'huile d'olive employée par Wells et Corper (28) ou l'huile de ricin [Kendall, Walker et Day (29)], soit *des esters d'acides gras à courte chaîne*, tels que l'acétate ou le butyrate d'éthyle utilisé surtout par Lobstein (30) ou la monobutyrine, la tributyrine (Michaelis et Nakahara) et les mono- di- et tri-glycérols [Bloch, Matter et Suter (31)], *réactifs qui ne sont pas spécifiques des lipases, mais concernent plutôt les estérases simples.* Mentionnons à ce sujet que Hoshishima (32) a pu préparer une estérase cristallisée à partir de Bacille tuberculeux aviaire.

Andrejew et Gernez-Rieux insistent sur le fait qu'à l'heure actuelle on ne connaît que peu d'études quantitatives de l'activité lipasique des différentes Mycobactéries, *étudiée en tant qu'hydrolyse des esters polymérisés solubles d'acides gras à longue chaîne* (C^{12} à C^{18}) tels que les Tweens.

Davis et Dubos (33) ont introduit le Tween 80 dans le milieu de culture des bactéries et ont remarqué d'une part que l'activité lipasique libérant l'acide oléique à partir de cet ester est nuisible à la multiplication des Bacilles tuberculeux et que, d'autre part les filtrats de culture effectuées en présence du Tween 80 manifestent dans certains cas *(Mycobacterium phlei)* une nette activité lipasique.

L'hydrolyse des Tweens 60 et 80 par les Bacilles tuberculeux a été signalée également par Hattori et ses collaborateurs (34), puis Prina (35) a étudié la dégradation des Tweens 20, 40 et 60.

Andrejew et Gernez-Rieux ont employé, dans leurs recherches, une *méthode manométrique* dérivant de celle de Copenhaver, Stafford et Mac Shan (36) et une *méthode chimique* basée sur la technique de Bier (37). Nous n'insistons pas plus en détail sur ces techniques et renvoyons à ce sujet aux travaux de ces auteurs.

Ayant ainsi exposé les méthodes les plus utilisées pour la recherche de l'activité lipasique des microorganismes, nous tenons à faire remarquer qu'il s'agit là principalement de *techniques d'identification plutôt que de dosage.* Pour nos travaux, nous avons choisi la *méthode titrimétrique* pour mesurer l'*activité lipasique.*

C'est Willstaetter qui, le premier, eut l'idée de doser les lipases par la *méthode alcalinimétrique*, basée sur le principe suivant : *Doser titrimétriquement les acides gras mis en liberté par l'action enzymatique, soit à partir d'une graisse proprement dite, soit à partir d'un substrat plus hydrosoluble, tel que le butyrate d'éthyle par exemple.*

Les modifications qui furent ensuite apportées à cette méthode permirent l'introduction d'un *potentiomètre*, employé pour la première fois avec succès par Glick (38), puis par Schwert et ses collaborateurs (39) pour de nombreuses estérases.

Après avoir ajusté le substrat à examiner à un pH en zone alcaline, c'est-à-dire pH = 8,2, l'hydrolyse débute selon les principes de Willstaetter. Par l'action enzymatique, il y aura libération de l'acide gras faisant virer le degré de la concentration ionique vers la zone acide. On

obtient ainsi une certaine différence de pH que l'on évalue par rapport au temps d'action. En ramenant ensuite la réaction du milieu vers l'alcalinité à l'aide de NaOH N/10 jusqu'au pH initial de 8,2, on crée les conditions optimales pour l'activité de la lipase.

Willstaetter, par contre, laissait évoluer la dégradation lipidique dans le milieu devenu acide; dans ces conditions, *le pH du milieu vire vers la zone acide proportionnellement à la marche de l'hydrolyse qui, à un certain moment, se trouve ainsi freinée ou arrêtée prématurément, ce qui fausse les résultats.*

A cette cause d'erreur il faut ajouter encore le fait que Willstaetter et ses collaborateurs, ainsi que Vogel et Laeverenz, malgré l'adjonction d'*oléate de calcium ou d'oléate de sodium* comme stabilisateurs, ont travaillé avec des émulsions extrêmement peu stables, ce qui ne permettait pas toujours d'obtenir des résultats valables.

Desnuelle, Constantin et Baldy (40) ont eu le mérite d'avoir essayé de remédier à cet inconvénient en metttant au point une technique utilisant comme substrat *une émulsion d'huile d'olive stabilisée par la gomme arabique*, et comme activateurs le *taurocholate de sodium et le chlorure de calcium*. L'huile d'olive que nous avons employée pour nos expériences était une huile pure « *Oleum olivae neutralisatum stérilisatum* » (Siegfried, *Zofingue*). Cette huile est conditionnée en petits flacons de 50 cc hermétiquement clos, ce qui nous donnait toutes les garanties d'un réactif stable et protégé du contact de l'air.

Par mesure de prudence, nous avons toujours préparé de nouvelles émulsions au moyen d'un flacon intact, que nous entamons au moment de l'emploi, pour éviter le *phénomène d'oxydation de l'huile d'olive*. Nos prédécesseurs dans le *Laboratoire de Microbiologie*, et notamment Christen (41), auquel nous renvoyons pour d'autres considérations concernant la composition, ont eux aussi toujours travaillé avec cette même huile d'olive.

En raison de sa stabilité et, comme l'écrit Desnuelle, de la possibilité d'obtenir d'excellents résultats dès qu'on définit judicieusement les conditions opératoires, nous avons eu recours à l'émulsion d'huile d'olive préparée selon les indications de cet auteur.

Préparation de l'émulsion:

Dans un mixer à lames rotatives on verse 165 cc d'une solution préalablement filtrée de gomme arabique à 10 %, 15 g de glace pilée et 20 cc d'huile d'olive pure et neutre. On agite violemment pendant 3 minutes pour émulsionner.

On distribue en flacons bouchés hermétiquement, et cette suspension se conserve ainsi à 5° pendant plusieurs semaines, sans laisser apparaître de modifications sensibles dans son comportement au cours des dosages lipasiques.

Mesure de l'activité lipasique selon la technique de Desnuelle:

Dans un becher de 50 cc, on introduit :

Émulsion d'huile d'olive	10 cc
Tampon Sigma *)	8 cc
Solution de Taurocholate de sodium à 20%	1 cc
Eau distillée	11 ou x cc

On dispose le becher dans un thermostat à 37° et l'on y plonge l'électrode en verre et l'électrode de référence d'un *pH -mètre à lecture directe.* On agite doucement le liquide au moyen d'un petit agitateur mécanique et on fait arriver à la surface de ce liquide un lent courant d'azote dépourvu de CO^2. On amène enfin le pH à 8,2 au moyen de NaOH N /10 décarbonaté. La mesure peut évidemment être faite sur n'importe quelle préparation de *lipases* pancréatiques ou autres. Nous décrivons ci-après, à titre d'exemple, la détermination de l'activité lipolytique *d'un extrait aqueux de pancréatine.* Cette pancréatine est obtenue, d'après le fabricant, en traitant plusieurs fois par l'acétone et l'éther sulfurique des pancréas de porc préalablement broyés. Une fois sec, le mélange de poudre et de fibres est soumis à une série de broyages et tamisages. Le produit final est une poudre passant entièrement à travers le tamis n° 90.

On agite doucement pendant 20 minutes 100 mg de *pancréatine* avec 10 cc d'eau bidistillée à une température de 1° à 5°. On centrifuge la suspension pendant quelques minutes à 10 000 t/mn dans une centrifugeuse refroidie à 5°. Conservé à — 10°, le liquide limpide décanté possède une activité à peu près constante pendant 3 jours. *L'activité disparaît d'ailleurs d'autant plus vite que le produit est moins concentré,* aussi ne le dilue-t-on qu'au moment de l'emploi.

On ajoute à 1 cc de cette solution 19 cc d'eau bidistillée, puis on ajoute X cc de cette dilution finale au contenu du becher. Quand l'aiguille du pH-mètre passe sur la graduation 8,0, on déclenche un chronomètre et l'on introduit, au moyen d'une micro-burette graduée 1/100e de cc, une quantité exactement suffisante de NaOH N /10 pour ramener le pH à 8,2. A ce sujet, on emploie une pipette horizontale graduée à 1/100e dont la pointe est étirée vers le bas. L'extrémité de la pipette est munie d'une seringue en laiton à piston fileté. On note le temps que met l'aiguille pour revenir à pH = 8,0 et l'on introduit encore du NaOH N /10 jusqu'à pH = 8,2. Après plusieurs opéra-

*) Le tampon Sigma (4648, Easton Avenue, St-Louis, U.S.A.) contient : 0.005 mol en tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane, 0,02 mol en chlorure de sodium. Il a pour principal avantage d'être compatible avec les ions Ca^{++}. Quand le mélange réactionnel ne contient pas d'ions Ca^{++}, un tampon phosphaté de même molarité fait aussi bien l'affaire.

tions, on trace la courbe des équivalents acides libérés par la lipase en fonction du temps.

Desnuelle et ses collaborateurs concluent : « *Aux erreurs d'expérience près, les points obtenus pendant chaque série de mesures sont en ligne droite. La réaction de lipolyse se trouve donc être d'ordre 0 dans ces conditions expérimentales. Ce fait provient vraisemblablement d'une grande affinité de la lipase pour son substrat et de la présence d'un grand excès de substrat et d'eau. Quoi qu'il en soit, il facilite beaucoup l'interprétation ultérieure des résultats, puisque la quantité d'enzyme peut être directement déduite de la pente des droites et la concentration au temps 0 n'a pas besoin d'être aussi soigneusement standardisée qu'au cours des réactions d'ordre 1. Cette dernière circonstance est particulièrement favorable dans le cas présent, où la concentration du substrat en émulsion est de toute évidence assez mal définie. Elle représente un facteur décisif de réussite de l'opération.*

« *La reproductibilité des expériences est à peu près parfaite. De nombreux essais ont été effectués avec la même quantité d'enzyme, mais avec diverses émulsions et diverses préparations enzymatiques* ».

En somme, la technique semble réunir toutes les qualités que l'on est en droit d'exiger *d'un test quantitatif d'activité enzymatique.* Desnuelle propose de définir l'unité lipase comme étant la *quantité d'enzyme qui libère 10 γ équivalents d'acide pendant 1 minute, dans les conditions opératoires décrites ci-dessus.* L'activité spécifique d'une solution quelconque de lipase sera le nombre d'unités lipase par mg d'azote.

Quelques commentaires méritent cependant d'être faits au sujet de cette technique :

L'un des facteurs de réussite de la présente étude est la grande affinité que possède la lipase pour les triglycérides dans les conditions expérimentales employées. On a donc intérêt à choisir pendant la mesure un pH aussi proche que possible du pH optimal de l'enzyme, et à ajouter au mélange réactionnel divers accélérateurs de la lipolyse. Dans le cas présent, ces activateurs sont le *taurocholate de sodium* et le *chlorure de calcium.*

Le *chlorure de calcium*, outre son effet accélérateur bien connu, *possède l'avantage de se combiner, à pH 8,0, avec les acides gras pour former des savons de Calcium insolubles.* Les acides gras libérés au cours de la lipolyse se trouvent donc remplacés, molécule pour molécule, par de l'acide chlorhydrique lequel, grâce à son ionisation plus complète, provoque des variations de pH beaucoup plus franches.

Desnuelle fait le raisonnement suivant : « *Le fait que l'on titre de l'acide chlorhydrique pendant la détermination suggère que la mesure potentiométrique est susceptible d'être effectuée à un pH inférieur à 8,0 et que la technique doit par conséquent permettre de mesurer la vitesse de la lipolyse en milieu neutre ou acide. Il n'en est malheureusement rien, car dès que le pH tombe au-dessous de 8,0 les savons de calcium se forment*

mal. Le titrage est alors faussé par la présence d'acides gras peu ionisés. En d'autres termes, la technique représente un simple test d'activité à pH constant. Elle ne permet pas de tracer la courbe d'activité de la lipase en fonction du pH ».

Notons enfin que la concentration du *taurocholate de sodium* au moment de la mesure est de 0,6 %. Dès que l'on diminue cette concentration, l'alignement des repères de la courbe devient moins bon et les résultats sont moins reproductibles. Toutefois, comme le signale Borgstrœm (42), on pourrait penser qu'en présence d'une quantité de taurocholate aussi élevée, la lipase possède deux pH optimaux d'action : pH = 6,0 et pH = 9,0 à 10,0, donc situés de part et d'autre de la valeur habituelle 8,0; si ce fait était exact, le pH = 8,0 auquel s'effectue la mesure serait mal choisi. Pour les raisons indiquées plus haut, il est indispensable de savoir si la lipolyse est réellement accélérée lorsque le pH tombe au-dessous de 8,0; les essais de Desnuelle pratiqués à pH = 9,0 ont montré que la vitesse ne s'accroît pas quand le pH est plus élevé que 8,0. Cet auteur conclut que vraisemblablement les observations de Borgstrœm ne sont strictement valables que dans ses conditions expérimentales. *Dans les conditions choisies par* Desnuelle, *les mesures à pH = 8,0 semblent bien s'accommoder de la présence de taurocholate en forte proportion.*

Dans *la partie expérimentale* de notre travail nous aurons l'occasion de revenir sur l'ensemble de cette technique et son argumentation.

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE II

DESCRIPTION ET MONTAGE DES APPAREILS

Réactifs :

Pour mener à bien nos expériences, nous avons préparé l'émulsion de gomme arabique comme indiqué dans le chapitre précédent. D'autre part, nous avons vu que les réactifs suivants sont nécessaires pour la mesure du pouvoir lipasique :

— *Une solution tampon composée de :*

Trishydroxyméthylaminométhane	0,005 mol
Solution de chlorure de calcium	0,020 mol
Solution de chlorure de sodium	0,040 mol

— *Une solution de taurocholate de sodium à 20 %.*

— *De l'eau bidistillée.*

Pour préparer le mélange réactionnel, on introduit dans un becher de 50 cc environ :

Émulsion de gomme arabique	10 cc
Solution tampon	8 cc
Solution de taurocholate de sodium	1 cc
Eau bidistillée	N cc à 10 cc

Ce mélange est disposé à 37° en agitant soigneusement; il présente un pH initial de 7,07 que l'on rajuste à 8,2 au moyen de NaOH N/10. Puis on ajoute 1 à X cc de la solution lipasique à tester, *en déduisant une quantité proportionnelle d'eau distillée du mélange*, de façon à avoir toujours un volume final de 30 cc.

La réaction commence immédiatement; aussitôt que le pH est tombé à 8,0 on le réajuste au moyen de NaOH N/10 à son taux initial de 8,2.

Étant donné que la réaction évolue constamment, le potentiomètre enregistre rapidement un pH de 8,0. Grâce à notre appareillage que nous allons décrire un peu plus loin, le temps nécessaire pour passer

de pH 8,2 à pH 8,0 et de revenir à la première valeur après addition de NaOH N/10 *est exactement enregistré sur le papier par le bras scripteur de l'enregistreur automatique.*

Ces enregistrements se répètent jusqu'à épuisement de l'activité lipasique et peuvent, dans certains cas, comme nous l'avons contrôlé, dépasser trois heures.

Cependant, nous avons constaté au cours de nos expériences qu'un contrôle de l'activité lipasique pendant environ une heure est suffisant pour des solutions aqueuses de lipases, tandis que pour des solutions huileuses de lipases le temps de contrôle peut être plus raccourci encore.

Pour nos mesures de l'activité lipasique nous nous sommes servi d'un système d'enregistrement automatique imaginé par J. Meyer *et ses collaborateurs*, dont la seule intervention manuelle est l'addition de NaOH N/10.

Cet appareil a été construit par la *Maison* Electrona *(Strasbourg-Lingolsheim)* après de nombreux essais préliminaires et une mise au point judicieuse.

Description de l'appareillage:

Nous tenons à donner une photographie et un schéma descriptif de cet appareillage qui, mieux que de longues explications, illustrent le montage et le fonctionnement de ce dispositif.

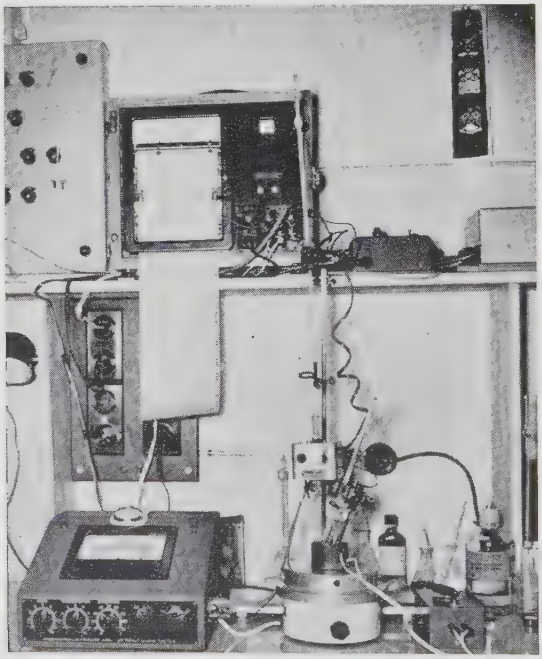


Fig. 1

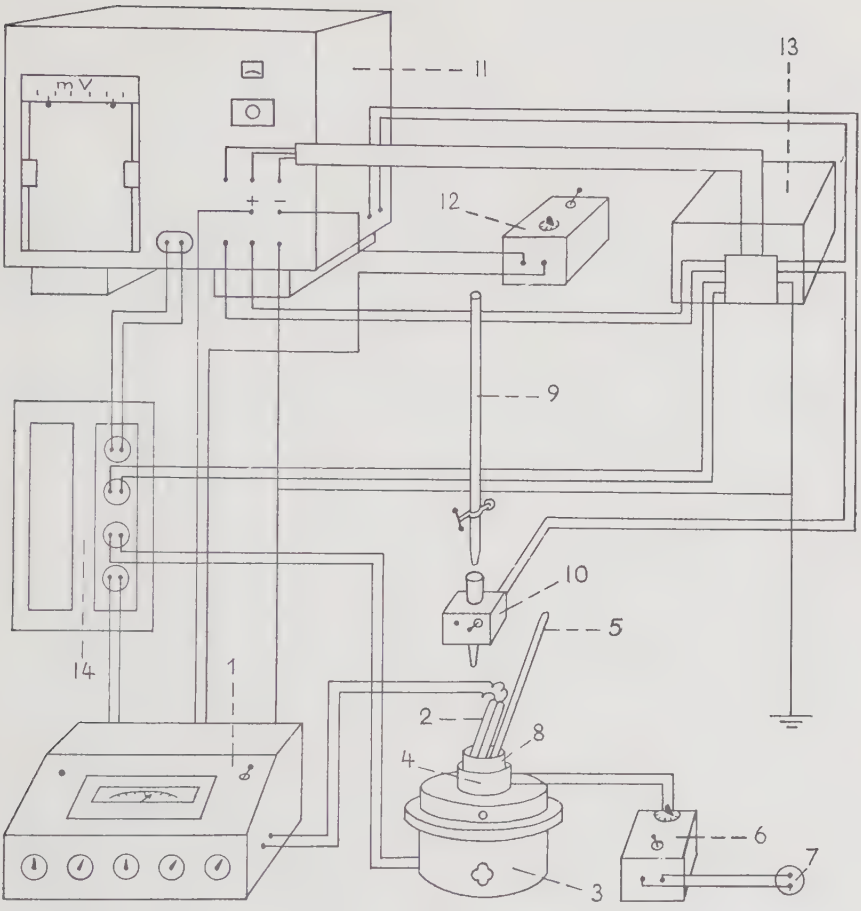


Fig. 2

1) pH-mètre; 2) Électrodes; 3) Agitateur magnétique; 4) Calotte chauffante; 5) Thermomètre; 6) Thermorégulateur; 7) Prise de courant continu; 8) Becher; 9) Burette; 10) Électropipette magnétique; 11) Enregistreur automatique; 12) Appareil de contretension; 13) Relais; 14) Tableau de prise de courant. (Le commutateur général n'y figure pas.)

Comme on le voit, l'ensemble se compose de six éléments principaux :

— Le pH-mètre avec ses électrodes;

— Le système de chauffage muni d'un thermostat, d'un thermomètre et d'une calotte chauffante.

— L'agitateur magnétique.

— Le bloc magnétique muni d'une microburette pour la distribution du NaOH N/10.

— L'enregistreur automatique avec appareil de contretension et relais.

— Le tableau de prises de courant.

Il importait de prendre en considération l'éventualité d'une panne de l'enregistreur automatique, instrument excessivement sensible. Pour pallier cet inconvénient et éviter d'interrompre une expérience en cours, il fallait prévoir un dispositif de sécurité sur le tableau de prises de courant.

On a donc relié directement les quatre prises de courant à un seul commutateur (à droite sur le tableau des prises), tandis que les prises de gauche sont indépendantes.

Nous passons maintenant à la description de chaque élément de ce montage :

pH-mètre-titrimètre J. Tacusel, type TS 4:

L'appareil se présente sous forme d'un boîtier-pupitre comportant sur ses différentes faces les éléments suivants :

Face arrière : un répartiteur de tensions d'alimentation avec fusibles et une prise de terre.

Face supérieure : un voyant, un interrupteur « *arrêt-marche* » et un appareil indicateur avec *cadran gradué en millivolts* (deux échelles 400-0-400) *et en unités pH* (une échelle 0-14 en noir et une échelle 5,5-8,5 en rouge).

Face latérale droite : une prise femelle (type P) et une douille isolée rouge pour le branchement des électrodes de mesure de pH (couple *verre-calomel*). Une prise femelle en saillie (type 0) et une douille isolée noire pour le branchement des électrodes destinées aux mesures du potentiel (couple *électrode métallique-électrode de référence*).

Face avant, de gauche a droite : un potentiomètre de 0, règlant le zéro de l'amplificateur, un potentiomètre portant l'indication « *standardisation* » permettant d'effectuer la compensation du potentiel d'assymétrie de l'électrode de verre. Un correcteur de température gradué de 0 à 100°. Un converseur GE/0-14, donnant la possibilité d'effectuer les mesures soit sur la gamme principale (pH = 0 à 14,0 ou 400-0-400 mV), soit sur la gamme étalée (pH = 5,5 à 8,5 ou 80-0-80 mV). Un commutateur à quatre positions, permettant de passer de la *position* 0 à la *position mesure*, respectivement pour le circuit pH et pour le circuit potentiel. La lecture du résultat s'effectue sur l'échelle du cadran correspondant à la position du commutateur.

Mise en service de l'appareil:

Installer l'appareil sur une surface horizontale. S'assurer que le fusible du répartiteur de tension est bien sur la position correspondant à la tension moyenne du secteur.

Pour le réglage du 0 *mécanique* on se sert, s'il y a lieu, et avant de mettre l'appareil sous tension, de la vis située sur la vitre de l'instrument indicateur pour ramener ainsi l'aiguille sur la graduation 0 de l'échelle millivolts (0 mécanique). Ce réglage doit être effectué avec grand soin et contrôlé périodiquement. Un « *faux 0 mécanique* » entraîne la nécessité de retoucher le « *potentiomètre de 0* » lorsqu'on déplace le bouton du commutateur de l'une à l'autre des positions 0.

Relier la douille située à l'arrière du boîtier à une bonne prise de terre.

Vérifier si le commutateur de droite est bien sur l'une des deux positions 0. Brancher l'appareil au secteur, le mettre sous tension à l'aide de l'interrupteur et attendre 15 minutes environ.

Le commutateur étant sur la position 0 voisine de l'indicateur « *pH* » ou « *POT* », selon la nature des mesures à effectuer, et l'inverseur « *GE/0-14* » sur la position « *GE* » (sensibilité maximale), amener l'aiguille de l'instrument indicateur exactement sur la graduation du 0 mécanique qui a été réglé précédemment. Passer sur la position « 0-14 », l'aiguille du galvanomètre doit rester exactement sur la graduation 0 de l'échelle mV. S'il n'en est pas ainsi, on coupera l'alimentation de l'appareil et on retouchera le réglage du 0 mécanique comme indiqué ci-dessus.

Exécution des mesures:

INSTALLATION DES ÉLECTRODES :

Pour les mesures de pH, introduire les électrodes, après les avoir retirées de leurs tubes de protection, dans le support en plexiglas et serrer les vis de fixation à tête moletée. Prendre soin de placer l'électrode de verre légèrement en retrait par rapport à l'extrémité de l'électrode au calomel. On diminue ainsi le risque de briser la boule contre le fond du récipient où sont effectuées les mesures.

S'assurer qu'aucune bulle d'air ne vient interrompre la colonne de liquide, *et par conséquent la continuité électrique du circuit*, à l'intérieur de chacune des électrodes. Au cas contraire, retirer l'électrode du support et la secouer à bout de bras, l'extrémité active orientée vers le bas, de manière à faire redescendre le liquide de remplissage.

Pour les mesures de potentiels, installer sur le support les électrodes convenant aux mesures à effectuer. Dans le cas de mesures simultanées de pH et de potentiels sur un même échantillon de produit, on peut utiliser une seule électrode au calomel, commune aux deux circuits.

BRANCHEMENT DES CORDONS :

Brancher les électrodes aux prises de la face latérale droite de l'appareil. La prise du cordon blindé de l'électrode de verre sera introduite dans la prise coaxiale type 0. La fiche banane du cordon de l'électrode calomel sera introduite soit dans la douille isolée rouge (*mesure de pH*) soit dans la douille isolée noire (*mesure de potentiels*). Pour les mesures simultanées de pH et de potentiels avec électrode de référence commune aux deux circuits, on utilisera le fil de branchement spécial en intercalant entre cette électrode et le titrimètre un décaleur d'origine.

Avant les mesures, rincer les électrodes soit par un jet d'eau, soit en les plongeant à plusieurs reprises dans un becher contenant de l'eau distillée. Prendre soin de ne pas mouiller la tige de l'électrode de verre jusqu'au niveau de la tête en plexiglas, pour éviter la formation d'un film d'humidité qui pourrait provoquer des erreurs de mesure par défaut d'isolement. Après rinçage, essuyer les électrodes avec l'extrémité d'une languette de papier filtre.

STANDARDISATION :

Circuit pH :

Régler le correcteur de température sur la valeur de température à laquelle seront faites les mesures. Pour les mesures courantes à la température du laboratoire, amener l'index du bouton sur la valeur 20.

Plonger les électrodes dans une solution tampon (de préférence d'un pH voisin de celui du produit à étudier), amenée à la température choisie pour les mesures. La boule de l'électrode de verre doit être complètement immergée. Donner deux ou trois mouvements d'agitation au liquide pour assurer son renouvellement à la surface des électrodes.

Vérifier si l'aiguille du galvanomètre est bien au 0, et l'y ramener le cas échéant à l'aide du potentiomètre de 0. Placer le commutateur sur la position « pH ». Se servir du potentiomètre de standardisation pour amener l'aiguille du galvanomètre à indiquer exactement la valeur de la solution tampon.

Si l'on emploie une solution tampon de pH = 5,5 à 8,5, on a intérêt, pour obtenir une plus grande précision, à effectuer ce réglage sur la position « GE » de l'inverseur. Ramener ensuite le commutateur sur la position 0 et vérifier si l'aiguille du galvanomètre revient bien au 0. Dans le cas contraire, effectuer la correction nécessaire, puis retoucher la standardisation jusqu'à obtenir deux indications consécutives exactes pour le 0 et pour la valeur tampon.

Revenir sur la position 0 avant de retirer les électrodes de la solution tampon. Rincer les électrodes à l'eau distillée. L'appareil est alors prêt pour les mesures.

Circuit potentiel :

Les potentiomètres de standardisation et de correction de température sont automatiquement mis hors circuit lorsqu'on effectue des mesures sur la position « *POT* » du commutateur. Le seul réglage à faire est celui du *0 mécanique* en opérant comme il a été indiqué ci-dessus.

MESURES :

Pour les mesures du pH, après avoir procédé à la standardisation, rincer les électrodes et les essuyer, puis les plonger dans le produit à étudier. Effectuer la mesure en manœuvrant le commutateur de la position 0 à la position pH, l'inverseur GE/0-14 étant sur la position 0-14.

Lire sur l'échelle correspondante (0-14) la valeur indiquée par l'aiguille du galvanomètre. Si le pH du produit à étudier est compris entre 5,5 et 8,5 on a intérêt à placer l'inverseur sur la position GE. La lecture s'effectue alors sur la gamme 5,5-8,5 (échelle rouge). Dans le cas contraire, ne jamais passer sur la position GE sans avoir au préalable effectué l'ajustement du circuit au moyen du décaleur d'origine.

Une fois la mesure terminée, ramener le commutateur sur la position 0 avant de retirer les électrodes du produit à étudier. Rincer les électrodes et les essuyer.

REMARQUES :

Le réglage de la standardisation est d'une grande stabilité sous réserve que la température des électrodes ne varie pas d'une façon importante. Dans des conditions de travail normales, il suffit de la contrôler une ou deux fois par jour.

Au cours de mesures d'une certaine durée, par exemple lorsqu'on établit une *courbe de neutralisation*, il n'y a pas d'inconvénient à laisser le commutateur sur la position pH aussi longtemps qu'il est nécessaire.

Le pH de la plupart des solutions tampon *varie en fonction de la température*, de même que celui des produits à étudier. Pour des mesures précises, il est donc nécessaire de connaître avec exactitude la température à laquelle on travaille et la valeur du pH de la solution utilisée à cette température.

Lorsqu'on opère à des températures différentes de la température ambiante, il convient de laisser les électrodes en contact avec la *solution tampon et le produit à étudier* pendant un temps suffisant pour atteindre l'*équilibre des températures*. Les températures de chacun des produits et de la solution tampon ne doivent pas différer de plus de quelques degrés.

Si après une série de mesures à une température déterminée on désire opérer à une température différente, il est nécessaire de procéder à un nouveau réglage de standardisation, en utilisant une solution tampon amenée à la nouvelle température de travail.

Il est recommandé, chaque fois que la chose est possible, d'effectuer les mesures à la température ambiante. Sinon, opérer sur des volumes de solution assez importants (200 cc et plus) pour éviter des variations de température rapides.

L'encrassement des électrodes est une cause fréquente d'erreur de mesure. L'électrode de verre doit être rincée à l'eau distillée après chaque mesure; en cas de formation de dépôts adhérents, on utilisera pour le nettoyage, selon la nature du produit à éliminer, soit une *solution acide* (HCl N/10) soit une *solution à agent mouillant* (Teepol, etc.) soit un *solvant organique* (alcool, acétone, dioxane, chloroforme), en faisant suivre le traitement d'un rinçage abondant à l'eau distillée. Entre les mesures il est bon de laisser l'électrode de verre fixée sur le support et branchée à l'appareil, la boule plongeant dans un becher contenant de l'eau distillée. Les électrodes de verre neuves devront être plongées dans l'eau distillée pendant une heure au moins avant l'emploi.

L'électrode au calomel peut être nettoyée comme l'électrode de verre et, de plus, on l'essuiera à l'aide d'un morceau de tissu propre. En dehors des mesures elle sera toujours conservée dans un tube de protection rempli d'une solution saturée de KCl, avec quelques cristaux de KCl en excès.

En cas d'utilisation quotidienne, il suffit de l'y placer pendant les périodes d'attente prolongée entre deux séries de mesures, et pendant la nuit. Pour les électrodes à orifice de remplissage latéral (types C 4, C 5 et C 6), il est conseillé d'introduire quelques cristaux de KCl à l'intérieur même de l'électrode.

Il est recommandé de contrôler de temps en temps les électrodes de réserve, car nous avons pu constater des modifications, surtout pour l'électrode au calomel.

DISPOSITIF DE CHAUFFAGE :

Ce dispositif se compose d'un *thermostat*, d'un *thermomètre* et d'une *calotte chauffante*.

Notre thermomètre est gradué de — 10° à 100°; il est fixé dans le support en plexiglas parallèlement aux électrodes. Il faut veiller à ce que l'extrémité inférieure des électrodes et du thermomètre soit à environ 1 cm du fond du becher, ceci pour éviter des chocs avec l'agitateur magnétique.

Quant au thermostat et à la calotte chauffante, on a dû éliminer un certain nombre de difficultés préliminaires; J. Meyer et ses collabora-

teurs ont choisi un thermostat électrique de JOUAN, muni d'un régulateur, le « *Simerstat* ». Nous travaillons avec un courant alternatif de 220 volts et un régulateur au mercure qui était ajusté à 37° (± 0,20°). Ce système a cependant un inconvénient : il provoque des dérivations brusques du galvanomètre; même des modifications légères du courant du secteur, par exemple lorsqu'on allume ou éteint une lampe ou lorsqu'on met un appareil en marche, sont ressenties et se manifestent sur le galvanomètre. On a donc essayé d'éliminer ce facteur par l'emploi d'une *cage de Faraday* disposée autour du becher. Finalement, cet inconvénient a pu être supprimé par l'emploi du courant continu à bas voltage. Un thermostat travaillant à 12 V nous permet d'amener très rapidement le liquide réactionnel à la température de 37°, température qui a été maintenue par une résistance intercalée.

Pour éviter des pertes de chaleur, HIRTZ a construit une *calotte chauffante* dans laquelle s'emboîte exactement le becher. Cette calotte est formée par des épaisseurs de papier mâché épais entre lesquelles se trouve le fil électrique chauffant. La calotte a une hauteur de 5 cm environ et est parfaitement isolée à l'intérieur et à l'extérieur. Comme elle est traversée par un courant électrique et pour éviter toute détérioration, il faut veiller à ne pas la mouiller au cours des manipulations.

Comme récipient, nous avons employé un becher en verre Pyrex de 100 cc et d'une hauteur de 6 cm environ. On introduit dans le becher un petit barreau de métal ferreux enrobé d'une gaine protectrice et on le pose sur l'agitateur magnétique. Un aimant entraîné par un moteur à vitesse variable, tourne à l'intérieur du capot de l'appareil. Celui-ci se branche directement sur le secteur et la mise en marche se fait en manœuvrant le *rhéostat* placé sur la paroi extérieure de l'appareil (voir sur le schéma). On peut ainsi régler la vitesse de rotation désirée et éviter un échauffement de l'agitateur magnétique lors d'un emploi trop prolongé.

Pour faciliter le titrage au moyen de NaOH, nous avons eu recours à un bloc magnétique PROLABO muni d'une *microburette*. Celle-ci a une contenance de 5 cc et est munie à l'intérieur d'une aiguille magnétique, dont le déplacement permet l'ouverture ou la fermeture de la pipette. Le déplacement de cette aiguille est réglé par l'enregistrement automatique, permettant ainsi de déterminer à l'avance la quantité de NaON N /10 à introduire ainsi dans le substrat réactionnel. Pour faciliter cette manipulation, nous nous sommes servi *d'une seconde burette montée au-dessus de la microburette*. Elle est munie à sa partie inférieure d'un tube en caoutchouc portant une pipette de Pasteur jaugée à 36 gouttes = 1 cc de NaOH N /10. Une pince de Mohr permet l'écoulement de la soude.

Étant donné la variabilité du nombre de gouttes nécessaires pour l'ajustement du pH au cours d'une expérience, nous avons introduit par la pipette supérieure dans la *microburette magnétique* le nombre de gouttes strictement prévu pour cet ajustement. Par le contact élec-

trique, l'aiguille magnétique est soulevée et la quantité de NaOH N/10 préalablement introduite dans la microburette s'écoule rapidement, ce qui nous évite de compter le nombre de gouttes. Au cours du temps de réaction, il nous était facile d'introduire chaque fois la quantité de NaOH N/10 nécessaire pour le prochain réajustement, manipulation qui devient très aisée après quelques essais.

Par le grand nombre d'expériences que nous avons faites, nous avons appris à préjuger du nombre de gouttes de NaOH N/10 nécessaires chaque fois pour l'ajustement du pH. D'autre part, le bloc magnétique nous a rendu un grand service par son signal lumineux qui, en plus du bruit caractéristique du relais de l'appareil enregistreur, nous indiquait le moment où il fallait ajouter la solution de NaOH N/10. Dès que le pH est ajusté, le signal lumineux s'éteint.

L'appareil enregistreur muni de son dispositif de contre-tension et de relais, est fabriqué par la *Maison* METRAWATT *(Nuremberg, Allemagne)*. Il est assez compliqué et nous renvoyons, en ce qui concerne son entretien, aux indications des constructeurs. Pour plus de clarté nous voudrions donner les détails suivants :

L'enregistreur et le relais avec son bloc magnétique sont reliés à un commutateur commun au courant alternatif de 220 V. L'enregistreur est muni d'une plume enregistreuse automatique à contact maximum et minimum. Nous illustrons le dispositif par le schéma suivant :

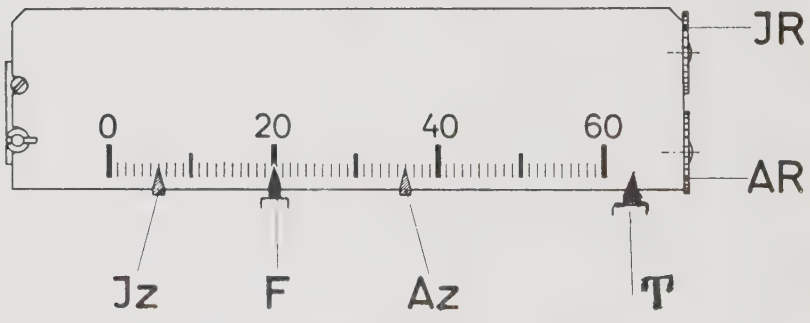


Fig. 3

JR — disque de réglage du contact minimum indiqué par l'index rouge Jz. La valeur maximale est réglable par le disque AR et la valeur correspondante est indiquée par l'index rouge Az.

L'établissement du contact se fait mécaniquement, sans limitation du diagramme, le couple moteur des enregistreurs étant suffisant. L'étrier de contact (ou les deux étriers) placé sur le *bras scripteur F* se déplace sur une bande métallique réglable à l'aide des *disques AR et JR*. Dès que l'index du *bras scripteur F* recouvre l'*index Az* ou *Jz*,

tous deux vernis en rouge, l'étrier de contact touche la bande métallique, ce qui amorce un *thyratron à cathode froide* situé dans un boîtier accessoire séparé. Après amorçage du thyratron, un relais de puissance à mercure est excité. Capacité de contacts 3 A /220 V. Ce relais se trouve également dans le boîtier accessoire séparé.

Sur le schéma on voit, à droite, l'*index de l'enregistreur* automatique du temps T. Le bras portant cet index se déplace horizontalement (comme F) mais dans une limite de 5 mm seulement. Chaque fois que F recouvre l'index Jz, celui-ci déplace son bras scripteur vers la gauche quand F recouvre Az, le bras scripteur se déplace en sens inverse, vers la droite.

Les déplacements des bras scripteurs F et T s'inscrivent sur une bande de papier à déroulement libre qui peut être réglé à trois vitesses différentes. Nous décrirons cette bande de papier un peu plus loin.

L'appareil de contretension fait fonction de *décaleur de zéro ;* il est alimenté par une pile qui doit toujours être débranchée quand l'appareil ne fonctionne pas. Cet appareil relié à l'enregistreur automatique permet le réglage du pH dans la zone désirée selon l'expérience à effectuer, à l'aide d'un bouton se trouvant à sa partie supérieure. Étant donné que nous avons également effectué des expériences à pH = 7,0, nous avons ainsi pu ajuster l'enregistreur.

Le relais, qui semble la partie du montage la plus insignifiante, est en réalité une des plus importantes; *c'est lui qui reçoit l'impulsion du pH-mètre et la transmet à la fois à l'enregistreur et au bloc magnétique.* Toute la rigueur de l'expérience dépend donc du bon fonctionnement de ce relais. Il n'est par conséquent pas étonnant que l'installation de cette pièce demande les plus grands soins.

Après cette description sommaire des différentes parties de ce montage, nous tenons à spécifier qu'il est nécessaire d'acquérir une certaine habitude concernant sa manipulation; il est également indispensable de préparer par avance tous les réactifs nécessaires à l'expérience.

Mise en marche des différents appareils:

La première manipulation consiste à relier le pH-mètre au courant du secteur. Le voyant vert indique le fonctionnement de l'appareil. On attend 15 minutes pour chauffer l'appareil, puis on ajuste à pH = 7,0 au moyen de la solution tampon. Si l'on a des mesures en série à faire, il est recommandé de ne pas débrancher le pH-mètre, puisqu'on évite ainsi le chauffage préalable qui autrement, est indispensable, ainsi que l'ajustement au pH — 7,0 à l'aide de la solution tampon.

Cependant, on a intérêt à contrôler la stabilité du pH toutes les quatre heures, même lors d'expériences continues, étant donné que le *point zéro* peut varier au cours de ces essais en séries. Ceci est surtout important pour l'ajustement initial du substrat réactionnel.

En second lieu, on branche le régulateur au moyen de l'interrupteur se trouvant sur le tableau de prises de courant. En même temps, on branche l'appareil de contretension et son décaleur de zéro (pile électrique). Tous ces appareils nécessitent un chauffage préalable de 5 minutes. On contrôle à ce moment la bonne position du 0 qui garantit le bon fonctionnement de l'appareil.

On introduit alors les différents réactifs dans le becher et on chauffe le tout à 37°, température de la réaction. A ce moment, on ajuste le pH à 8,0. A l'aide de l'appareil de contretension, on amène l'*index minimum Jz* à environ 5 mV ; cette précaution s'impose, car elle permet un réajustement du pH, tombé accidentellement au-dessous de 8,0. On ramène ensuite le pH à 8,2 au moyen de NaOH N/10. La tension de l'enregistreur est alors de 10 mV, ce qui correspond à une valeur approximative de 50 mV sur l'échelle de mesures (voir fig. n° 3) On amène l'*index Az* sur la position pH — 8,2 indiquée par la plume enregistreuse F, au moyen du disque AR. Il faut cependant veiller à régler l'*index Jz*, non pas à pH — 8,0, mais à environ 8,02, ce qui nous permet de nous préparer à temps pour l'addition de NaOH N/10, ayant été prévenu de l'imminence de cette manipulation par le déclenchement du relais et le signal lumineux du bloc magnétique.

Le *rouleau de papier enregistreur* est seulement mis en mouvement par l'ajustement du pH à 8,2. Nous avons toujours pris la précaution de noter sur le papier enregistreur la nature du produit à examiner, la date et l'heure de l'expérience.

A ce moment, on introduit l'enzyme lipolytique dans le substrat réactionnel et l'expérience commence.

L'enregistrement des réactions s'effectue automatiquement et le manipulateur n'a plus qu'à surveiller le fonctionnement parfait des différents appareils et à ajouter chaque fois la solution de NaOH N/10 pour ramener le pH de 8,0 à 8,2.

Mentionnons encore une précaution à prendre : avant de commencer une expérience prolongée, il importe de remplir d'encre le godet de la plume enregistreuse.

Résumons maintenant les instructions avec quelques détails supplémentaires pour le fonctionnement de l'ensemble de ce montage.

ÉLECTRODES :

Rappelons qu'il faut toujours compléter, après usage, la solution de KCl dans l'électrode au calomel. Ces électrodes seront conservées dans leur tube de protection.

PIPETTES :

Il faut bien entretenir la microburette et la pipette, et éliminer après usage toute trace de NaOH.

CHAUFFAGE :

Il est indispensable de régler l'appareil au pH voulu avec une solution tampon préalablement chauffée à la température à laquelle on veut travailler, dans notre cas 37°. Nous avons en effet pu constater lors de nos expériences, que les différentes réactions lipolytiques varient suivant la température.

pH-MÈTRE :

Le pH-mètre étant relié au courant du secteur, on évite des sautes de courant nuisibles au bon fonctionnement de l'enregistreur en branchant la calotte chauffante sur une batterie de courant continu. Ces troubles de circuit peuvent être gênants dans les heures de travail, où tous les appareils d'un laboratoire fonctionnent; on a donc intérêt à choisir les heures creuses. Lorsque dans la salle on met en circuit un appareil ou une lampe, ou si l'on interrompt le courant, on évite des amplitudes trop grandes du bras scripteur F en le maintenant entre deux doigts. Il ne s'agit là que de précautions à prendre si l'on ne travaille pas avec la *calotte chauffante* reliée au courant continu, dans le cas par exemple de l'emploi du « *Simerstat Jouan* ».

L'AGITATEUR :

Il ne doit être branché que pendant les expériences mêmes, pour éviter qu'il ne se surchauffe. Le becher avec l'agitateur doit être posé au centre de la plaque chauffante, ceci pour éviter les chocs du barreau métallique contre les parois du becher.

L'ENREGISTREUR DE TEMPS :

L'emboîtement de la bande de papier doit être parfait pour garantir un déroulement à plat et strictement vertical.

Il est nécessaire de nettoyer de temps en temps les plumes enregistreuses; à cet effet on emploie de l'eau distillée et on sèche à la température ordinaire.

Les bandes de papier sont munies sur le côté gauche d'une perforation ronde et du côté droit d'une perforation elliptique. Ces trous servent à déplacer le papier selon la vitesse désirée, que l'on règle à l'aide d'un tambour commandant la vitesse d'avancement. Ce dispositif garantit un déroulement régulier du papier.

Sur nos bandes de papier la distance de 1 cm séparant deux lignes horizontales équivaut à 30 secondes et par conséquent 6 intervalles correspondent à 3 minutes, temps que nous avons choisi pour nos mesures. Autrement dit, la vitesse de déroulement du papier était pour nos expériences de 1 200 mm/heure.

La plus grande partie de la largeur de la bande de papier est réservée à la plume enregistreuse F et exprime la variation étalée des valeur de pH.

Le bord droit, d'une largeur de 5 mm environ, sert à l'électroplume T qui inscrit chaque passage au niveau de Jz ou de Az comme nous l'avons déjà expliqué.

Dès que l'enzyme lipolytique est mise en action, la courbe évolue selon un tracé plus ou moins oblique vers la gauche. Dès que le pH = 8,0 est atteint, on ajoute au moyen de la microburette le nombre de gouttes de NaOH N/10 nécessaire pour ramener le pH à 8,2. Cette réaction demande 5 à 10 secondes et est enregistrée par un trait sensiblement horizontal sur la bande de papier. Il est important de noter à ce moment, directement sur le papier en mouvement, le nombre de gouttes de NaOH N/10 employé, ainsi que le pH limite atteint.

Après interruption de l'expérience, c'est-à-dire en principe après 30 minutes, nous obtenons ainsi un aperçu général de l'évolution de la courbe que l'on peut transcrire ensuite sur papier millimétré, où nous marquons en abscisse le temps en minute et en ordonnée le nombre de gouttes de NaOH N/10 utilisé.

CHAPITRE III

ESSAIS PRÉLIMINAIRES

Pour ces expériences, nous avons eu recours à *Mycobacterium phleï*, cultivé d'après les données de KROEHNE.

Nous avons tout d'abord essayé d'élucider le problème de l'existence de lipases hydrosolubles. A cet effet, nous avons également eu recours, comme nos prédécesseurs, *à différentes techniques devant nous permettre de libérer les enzymes endocellulaires*, telles que broyage, lyse par une forte concentration d'électrolytes (chlorure de sodium) ou de non-électrolytes (glucose), emploi préalable de solvants organiques (éther) et finalement attaque de la membrane cellulaire par l'enzyme *Lysozyme* inactive sur des substances lipidiques et lipasiques. La technique que nous avons suivie est celle de R. et C. VENDRELY et PALMADE (43) pour détruire l'enveloppe de certaines bactéries en vue d'extraire *l'acide désoxyribonucléique.*

Aucune de ces techniques ne nous a donné satisfaction et après avoir constaté qu'il est impossible d'isoler ainsi les lipases de *Mycobacterium phleï* dans un solvant aqueux, nous avons tenté d'isoler ces lipases dans un solvant non aqueux.

A ce sujet, nous avons employé le *toluène*, puis un solvant nouveau, le *diéthylène-glycol pur Merck* (DEG = $HO\text{-}CH^2\text{-}CH^2\text{-}O\text{-}CH^2\text{-}CH^2\text{-}OH$). Nous avons essayé d'extraire la lipase de *Mycobacterium phleï déshydraté* et de *bactéries humides préalablement lysées* dans une solution de chlorure de sodium à 5 % et broyées dans un mixer à lames rotatives. Le résultat de ces extractions était également négatif.

Nous nous sommes ensuite inspiré de la technique de NICLOUX (44) pour extraire la lipase contenue dans *la graine de Ricin.*

Nous avons émulsionné 1 g de *poudre de Mycobacterium phleï déshydratée* dans 20 cc d'huile d'olive et 30 cc d'eau distillée dans un mixer pendant 3 minutes. Le tout a été mis à l'étuve à 37° pendant 12 heures en agitant de temps en temps. On mélange encore une fois au mixer pendant 1 minute, puis on centrifuge à 4 000 t/mn. La même technique a été employée pour 1 g *de poudre de Mycobacterium phleï déshydratée, mais préalablement lysée* dans une solution hypertonique à 5 % de NaCl et en atmosphère d'azote.

La centrifugation pendant 20 minutes nous a donné trois phases formées par une couche d'huile surnageante, un gâteau blanchâtre constitué par les bactéries hydratées et encore émulsionnées dans l'huile, puis une phase aqueuse d'aspect laiteux. A l'aide d'une pipette, nous avons prélevé l'*huile surnageante* et avons ainsi obtenu deux réactifs : l'huile de M. phleï entier = HPE et l'huile de M. phleï lysé = HPL. Ils ont été éprouvés avec le substrat réactionnel suivant :

Émulsion de gomme arabique	10 cc
Solution tampon	8 cc
Solution de taurocholate	1 cc
Eau bidistillée	10 cc
HPE ou HPL	1 cc

Nous rapportons dans le tableau suivant la quantité de NaOH N/10 nécessaire pour neutraliser les acides gras mis en liberté en rapport avec le temps de réaction.

TABLEAU N° 1

Temps de réaction	NaOH N/10 en gouttes	
	HPE	HPL
15''	3	3
30''	2	2
45''	2	1
7'	0	—
8'	—	0

On constate que *les deux extraits huileux sont doués d'une action lipolytique*, se manifestant au moment où l'on ajoute les activateurs enzymatiques.

Étant donné que les deux réactifs avaient été préparés à partir d'un gramme de poudre bactérienne et qu'il nous a fallu, dans les deux cas, la même quantité de soude, *il faut conclure que la lyse préalable des bactéries n'a pas amélioré le rendement de l'extraction*, ce qui permet de supposer que la lipase bactérienne est principalement localisée dans *l'ectoderme de la cellule*.

On constate d'autre part que l'activité lipolytique se manifeste d'une façon intense tout au début de l'expérience pour s'arrêter au bout de quelques minutes, ce qui nous a induit à entreprendre une étude plus poussée sur la composition du substrat réactionnel.

Après avoir ainsi constaté que l'extraction des *lipases hydrosolubles* était plus difficile que nous nous y attendions, nous avons essayé de

préparer une *lipase liposoluble* à partir de *Mycobacterium phleï*. Nous avons préparé une suspension à 5 % dans l'huile d'olive de poudre microbienne déshydratée, en mélangeant dans le mixer pendant 3 minutes. On dispose cette suspension à 37°; on effectue une nouvelle homogénéisation, puis on laisse pendant 12 heures à la température du laboratoire en agitant de temps en temps. On centrifuge pendant 20 minutes à 4 000 t/mn et on obtient un *réactif huileux surnageant* (EHP = Extrait Huileux M. Phleï) que nous éprouvons par notre substrat réactionnel habituel. Nous donnons ci-dessous les valeurs mesurées :

TABLEAU N° 2

Temps de réaction	9"	28"	48"	1'12"	1'48"	2'24"	3'11"	4'36"
NaOH N/10 gouttes ..	3	3	3	3	2	2	2	2

En comparant ces résultats avec ceux du Tableau N° 1, on constate que la quantité de NaOH N/10 employée pour la dosage est sensiblement identique dans les deux cas, *d'où nous pouvons conclure que la méthode d'extraction proposée par* Nicloux *ne permet pas d'améliorer le rendement en lipase bactérienne.*

D'autre part, on note que l'activité lipasique s'épuise assez rapidement. C'est pourquoi nous avons essayé de modifier notre technique pour atteindre un *ralentissement de la vitesse de réaction.*

Pour ce faire, nous avons tout d'abord travaillé avec des doses d'extraits huileux plus faibles : 0,1 — 0,2 — 0,3 cc, ramenées à 1 cc au moyen d'eau distillée. Les résultats de ces mesures sont consignés dans le tableau suivant :

TABLEAU N° 3

Dose	Temps de réaction	4"	6"	12"	18"	21"	30"	39"	45"	46"	1'42"	2'33"	4'06"
0,1 cc	NaOH N/10 gouttes	—	—	3	—	—	—	2	—	—	1	—	—
0,2 cc	NaOH N/10 gouttes	—	3	—	—	3	—	—	2	—	—	2	
0,3 cc	NaOH N/10 gouttes	7	—	—	3	—	2	—	—	2	—	—	2

On voit que des doses de réactif lipasique plus faibles ne permettent pas de ralentir l'épuisement du pouvoir lipasique.

Nous avons ensuite essayé d'atteindre notre but en supprimant l'huile d'olive de notre substrat réactionnel, *pensant que la quantité d'huile apportée par notre extrait pourrait être suffisante pour contrôler l'activité de nos lipases microbiennes.* La composition du substrat réactionnel était dans ce cas la suivante :

Solution tampon	8 cc
Solution de taurocholate	1 cc
Eau bidistillée	21 cc
Extrait huileux	0,1 cc

Cette technique s'est également avérée décevante.

Nous avons alors envisagé la possibilité de freiner l'action de l'enzyme par *voie chimique*. En effet, la chimie des ferments nous apprend que pour une réaction enzymatique *la loi des masses* est valable. Dans notre cas, la réaction chimique catalysée par la lipase est la suivante :

$$\text{lipide} \xrightleftharpoons{\text{lipase}} \text{acide gras} + \text{glycérine.}$$

A son tour l'acide gras R-COOH se dissocie de la façon suivante dans un milieu aqueux :

$$\text{R-COOH} \rightleftharpoons \text{R-COO}^- + \text{H}^+$$

Le cation hydrogène libéré est celui que nous titrons à l'aide du NaOH. L'acide gras libéré par l'hydrolyse est faiblement dissocié dans l'eau, mais dans les conditions dans lesquelles nous travaillons, nous sommes en présence d'ions Ca^{++} contenus dans la solution tampon. Ces cations forment un sel insoluble avec l'anion provenant de l'acide gras, ce qui déplace l'équilibre de la réaction de gauche à droite, avec augmentation du degré d'acidité du milieu et conséquemment appel à une plus forte quantité de NaOH. En même temps, *par la loi d'action des masses*, l'équilibre de la première formule est également déplacé vers la droite avec augmentation de la vitesse d'action de la lipase.

Chimiquement, ce sont des ions Calcium qui accélèrent et le procédé de dissociation de l'acide gras et la saponification du lipide, *donc c'est eux qu'il faudra diminuer si l'on veut freiner la vitesse de la réaction.* Pour diminuer la concentration du Calcium, il y a deux moyens : soit préparer une nouvelle quantité de tampon n'en contenant pas, soit ajouter au substrat réactionnel un réactif capable de le fixer en plus ou moins grande quantité. Nous avons choisi la deuxième solution, *car en éliminant complètement le Calcium du substrat on ne pourrait achever quantitativement le titrage de l'acide gras que dans un temps assez long.*

Nous avons choisi l'*oléate de sodium* en solution aqueuse à 2 % comme fixateur du calcium, puisqu'il donne un *oléate de calcium insoluble.* La formule du premier substrat réactionnel nous a permis de réaliser la meilleure courbe :

Solution de taurocholate	1 cc
Solution tampon	2 cc
Solution d'oléate de sodium 2 %	1 cc
Eau bidistillée	26 cc
Extrait huileux de lipases	0.1 cc

Le tableau suivant exprime les résultats obtenus :

TABLEAU N° 4

Temps de réaction	7"	24"	44"	1'33"	1'37"	1'54"	2'34"	3'40"	6'40"
NaOH N/10 gouttes ..	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tout d'abord nous jugeons utile de faire quelques *considérations stoechiométriques* sur la composition du substrat réactionnel, surtout en ce qui concerne la quantité de calcium qui est précipitée par l'oléate de sodium.

Le poids moléculaire de l'oléate de sodium est de 304,44 celui de $CaCl^2.6\ H^2O$ est de 219,09.

La réaction qui se passe entre ces deux sels est la suivante :

$$CaCl^2 + 2\ \text{Na-oléinc.} \longrightarrow \underline{\text{Ca (oléinic.)}^2} + 2\ NaCl$$

Donc 219,09 g de $CaCl^2.6\ H^2O$ précipitent 608,88 g d'oléate de sodium. La solution tampon que nous employons dans le substrat réactionnel est 0,02 mol en $CaCl^2.6\ H^2O$, elle contient par conséquent :

$$\frac{219{,}09 \times 2}{100} = 4{,}3818 \text{ g par litre}$$

1 cc de tampon contient donc 0,004 3818 g de $CaCl^2.\ 6\ H^2O$ qui sont précipités par :

$$\frac{608{,}88 \times 0{,}0043818}{219{,}09} = 0{,}0122 \text{ g d'oléate de sodium,}$$

contenus dans 0,61 cc de solution d'oléate de sodium à 2 %.

Pour notre substrat réactionnel nous avons voulu prendre 2 cc de solution tampon et 1 cc de solution d'oléate de sodium. Par conséquent 1 cc d'oléate a précipité le calcium de 1,64 cc de solution tampon, ce qui revient à dire que 80 % du Ca^{++} des 2 cc de solution tampon ont été précipités par l'oléate de sodium.

Après ces considérations stoechiométriques, nous voulons encore souligner que nous avons pu obtenir une courbe satisfaisante, surtout en ce qui concerne la quantité de NaOH N/10 à ajouter chaque fois que l'on ramène le pH à sa valeur initiale, quantité réduite ici à 1 goutte, en diminuant des 3/4 la quantité de la solution tampon utilisée précédemment. *Si donc, en modifiant la formule du substrat, nous avons pu*

obtenir une diminution de la quantité de soude, nous ne sommes pourtant pas arrivé à espacer davantage les intervalles des différentes phases réactionnelles.

Pour cette raison nous avons modifié le substrat réactionnel en employant 0,1 cc d'extrait huileux des M. phleï entières (HPE) :

Solution de taurocholate	1	cc
Solution tampon	2	cc
Solution d'oléate de soude	2	cc
Eau bidistillée	25	cc
Extrait HPE	0,1	cc

Dans ce substrat on a la même quantité de solution tampon et d'oléate de soude, *par conséquent il n'y a plus d'ions* Ca^{++} *libres*, mais un excès d'oléate. Nous rapportons dans le tableau suivant les résultats de cet essai :

TABLEAU N° 5

Temps de réaction	6''	21''	43''	1'23''	3'22''	6'06''	12'33''
NaOH N/10 gouttes	1	1	1	1	1	1	1

On voit que la modification de la technique nous a permis *de rallonger la durée de l'activité lipasique.* Les adjonctions de NaOH N/10 s'espacent dans le temps, surtout vers la fin de la réaction, alors qu'au début il n'y a pas de changement notable. En comparant cet essai avec le précédent, on s'aperçoit que dans les deux cas, les quatre premières gouttes de NaOH N/10 tombent en une minute. Nous n'avons pas poussé ces recherches plus loin; ces essais préliminaires nous ont permis de constater qu'avec un peu de pratique, l'expérimentateur arrive très facilement à obtenir des courbes satisfaisantes à l'aide de son appareil enregistreur.

Ces expériences ont été effectuées avec l'extrait huileux de *Mycobacterium phleï entier;* nous avons jugé nécessaire de les répéter avec un *extrait huileux de M. phleï lysé* (HPL) d'après les techniques antérieurement indiquées. Nous reproduisons dans le tableau suivant les résultats obtenus en employant 0,1 cc de HPL, les autres conditions expérimentales restant identiques à celles de l'essai précédent :

TABLEAU N° 6

Temps de réaction	10''	27''	44''	1'14''	2'03''	4'36''	7'51''	10'14''
NaOH N/10 gouttes .	1	1	1	1	1	1	1	1

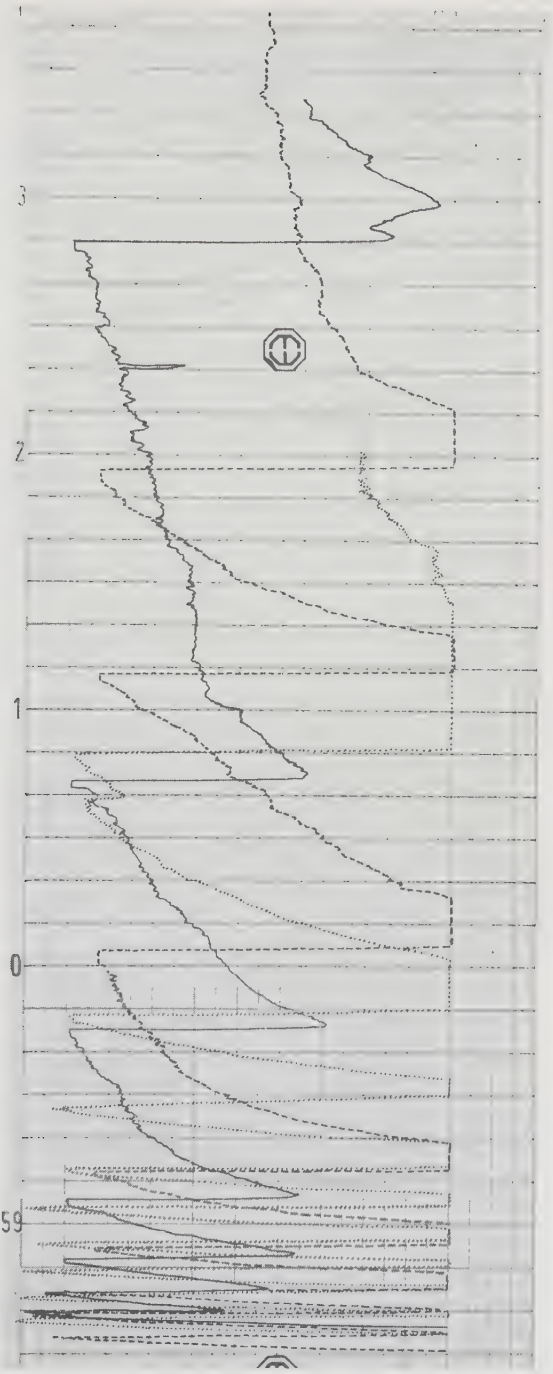


Fig. 4

Enregistrements automatiques des tableaux N^{os} 4, 5, 6.

Tabl. 4 : courbe.....
Tabl. 5 : courbe- - - - - -
Tabl. 6 : courbe_____

En dehors d'une légère diminution du pouvoir lipasique dû au processus de lyse, on constate que les résultats sont sensiblement identiques à ceux obtenus avec les extraits huileux de bacilles entiers.

A titre documentaire, nous rapportons ici les trois graphiques enregistrés automatiquement pour les trois derniers essais.

D'autre part, nous reproduisons sur papier millimétrique les 7 courbes comme suit :

TABLEAU N° 7

Courbe N°	Tableau N°	Extrait lipasique éprouvé
1	2	EHP
2	3	EHP 0,1 cc
3	3	EHP 0,2 cc
4	3	EHP 0,3 cc
5	4	HPE 1 cc oléate de Na
6	5	HPE 0,1 cc oléate de Na
7	6	HPL 0,1 cc oléate de Na

Nous notons en abscisse le temps en minutes et en ordonnée la quantité de NaOH N/10 en gouttes.

En considérant *l'influence de la composition du substrat réactionnel sur la vitesse de réaction des lipases* AAR *liposolubles*, on constate qu'il fallait modifier la composition du substrat réactionnel proposé par Desnuelle et utilisé par Christen. En effet, en employant ce substrat, la vitesse de réaction de l'enzyme est trop rapide pour permettre une étude détaillée du développement de la lipolyse. Nos essais nous ont montré qu'il y avait avantage à supprimer l'émulsion gommeuse d'huile d'olive, *puisque la quantité d'huile de l'extrait huileux est suffisante comme substrat spécifique pour les lipases à examiner.*

Nous avons d'autre part réduit la quantité de solution tampon de 8 cc à 2 cc pour les 30 cc de substrat réactionnel total et avons ajouté 2 cc de la solution à 2 % d'oléate de sodium dans le but de bloquer l'essentiel des ions Ca^{++}, intervenant comme accélérateurs de la réaction enzymatique.

Le freinage de la vitesse de dégradation lipolytique est nécessaire, étant donné que la lipase est dissoute dans l'huile et au moment de la réaction, les pôles lipophiles de la molécule enzymatique se trouvent ainsi en intime contact avec le lipide et peuvent immédiatement entrer en fonction dès qu'ils se trouvent dans les conditions de pH et de température optimales et en présence des activateurs enzymatiques.

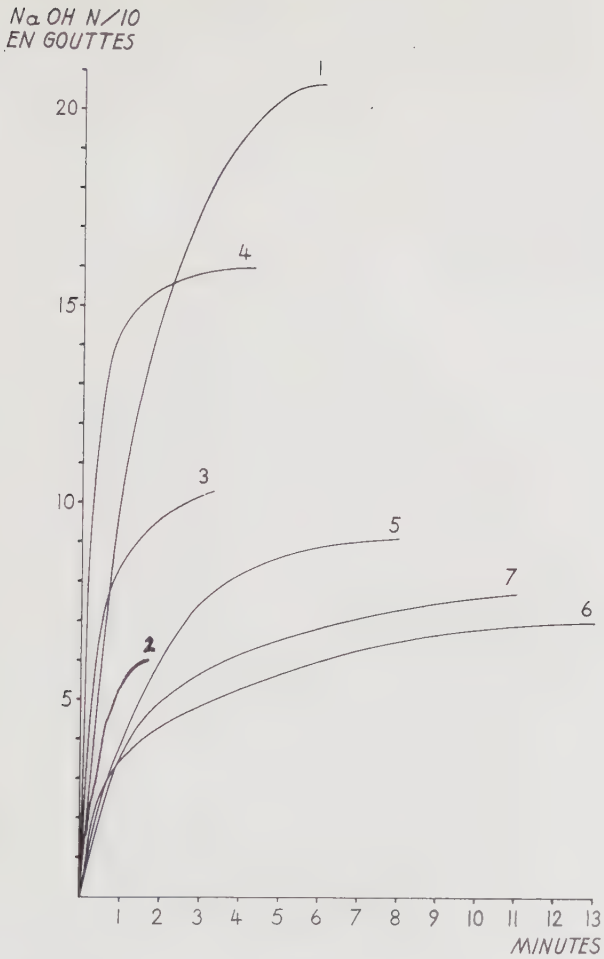


Fig. 5

Sept courbes de lipolyse réalisée par différents extraits lipasiques et de substrats modifiés.

Quelques considérations quantitatives sur la lipase liposoluble:

Il nous importait de mesurer la quantité de lipase liposoluble après extraction de *Mycobacterium phleï déshydraté* traité à la concentration de 5 % au moyen d'huile d'olive.

Nous avons extrait 1 g de poudre de *Mycobacterium phleï déshydraté* par l'huile d'olive; l'extrait huileux a été éliminé par centrifugation, le réseau bactérien est lavé à l'éther pour éliminer toute trace d'huile,

puis la masse bactérienne ainsi obtenue est déshydratée. D'autre part, nous avons employé 1 g de poudre de *bacilles phléiques* déshydratés non traités.

En examinant le pouvoir lipasique de ces deux produits, on peut déterminer, par différence, la lipase entrée en solution dans l'huile d'olive.

Pour effectuer ces mesures nous avons fait appel au substrat réactionnel modifié de Desnuelle.

Nous avons mesuré l'activité lipolytique des deux poudres pendant 30 minutes et les résultats ont été les suivants :

La poudre de *M. phleï déshydraté non traité* avait un pouvoir lipolytique correspondant à 55 gouttes de NaOH N/10, tandis que *la poudre bactérienne traitée par l'huile d'olive* a nécessité 49 gouttes de NaOH N 10, *ce qui nous permet de conclure à une diminution du taux de lipases dans ce dernier cas*, qui est égale à $\frac{6 \times 11}{55} = 11\ \%$, *ce qui représente la fraction de lipases phléiques solubles dans l'huile d'olive.*

On pourrait objecter à ce raisonnement qu'il n'y a pas de relation directe entre la lipase et la quantité de NaOH N/10 employée au cours du dosage. En effet, d'autres facteurs pourraient intervenir, se répercutant sur les quantités de NaOH ou intervenant comme catalyseurs de l'enzyme, de sorte que des lipases endocellulaires seraient mises en liberté. Cet argument ne joue cependant pas dans notre cas, puisque nous avons toujours travaillé avec des cellules microbiennes intactes.

Pour appuyer notre thèse, nous avons essayé de déterminer *les taux de lipases par dosage de l'azote total* dans nos différents extraits huileux. *Nous avons choisi la méthode classique de Kjelldahl en employant le catalyseur de* Beet *et* Furzey :

Sulfate de potassium	32 g
Sulfate de mercure (SO^4Hg)	5 g
Sélénium	1 g

Pour la kjelldahlisation, nous avons mélangé 1 cc d'extrait huileux 10 g du mélange catalyseur et 20 cc d'acide sulfurique concentré. Le tout est introduit dans une fiole de Kjelldahl de 300 cc. On chauffe directement au-dessus du bec de Bunsen, de façon à porter rapidement à l'ébullition. La seule précaution à prendre est de ne pas laisser monter les mousses trop haut dans le col. Dans ces conditions, au bout de 15 minutes d'ébullition, le mélange se clarifie et se résout en une liqueur jaune citron pâle qui est transvasée, après refroidissement dans un ballon jaugé de 200 cc et l'on complète à ce volume à l'aide d'eau distillée.

Tout l'azote contenu dans la prise d'essai se trouve ainsi dans le ballon jaugé sous forme de $(NH^4)^2SO^4$. On prélève 20 cc exactement

mesurés que l'on introduit dans *l'entonnoir de l'appareil* de Parnas-Wagner servant à la distillation de l'ammoniaque. Au préalable, nous avons procédé au nettoyage de cet appareil en chauffant le ballon à l'eau distillée, générateur de vapeur, jusqu'à l'ébullition. On introduit ensuite de l'eau dans l'entonnoir, on ouvre le petit robinet du flacon de sûreté, puis celui de l'entonnoir pour faire entrer l'eau dans le ballon de distillation. On ferme les deux robinets et on fait bouillir l'eau dans le ballon pendant quelques minutes, puis on interrompt le chauffage : il y a condensation des vapeurs d'eau dans le ballon et par la suite les eaux de lavage sont aspirées de la fiole de Kjelldahl et s'écoulent dans le flacon de sûreté. On les élimine en ouvrant le robinet de ce flacon. Nous avons répété cette manipulation à trois ou quatre reprises.

Pour la distillation de l'ammoniaque dans les prises d'essai, on fait bouillir l'eau dans le ballon comme précédemment; nous avons placé sous le tube du réfrigérant un becher contenant 20 cc d'HCl N/70 exactement mesurés. On couvre ce becher pour éviter des projections de NaOH qui pourraient se faire. Le tube du réfrigérant doit plonger dans l'acide chlorhydrique. Puis nous introduisons dans l'entonnoir successivement :

Solution contenant $(NH^4)^2SO^4$ après combustion ..... 10 cc
Lessive de soude à 50 % ..... 20 cc
Solution d'hyposulfite de soude ..... 10 cc
(à cause de l'emploi de $HgSO^4$ comme catalyseur)

Les deux robinets sont chaque fois ouverts, puis on les ferme, on chauffe à l'ébullition l'eau dans le ballon. La distillation une fois entamée, on la poursuit pendant 5 minutes. Le liquide dans le becher commence lentement à augmenter: il faut contrôler sa réaction au moyen de *rouge de méthyle*. Finalement, on enlève le becher sous le réfrigérant et on dose en retour la quantité de HCl N/70 qui n'a pas été neutralisée par l'ammoniaque distillée. Ce dosage est effectué avec du NaOH N/70.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

poudre de M. phleï entier = 0,00182 g/cc d'azote
poudre de M. phleï lysé = 0,00163 g/cc d'azote

On voit ainsi que *le dosage de l'azote confirme sensiblement les résultats que nous avons obtenus au moyen de la méthode ionométrique à l'appareil enregistreur*. Si dans la poudre lysée nous avons trouvé une valeur plus élevée que la valeur théorique (0,001619), il faut admettre que certains groupements protéiques ont été libérés par le processus de lyse.

Après avoir mis en évidence dans les extraits huileux la *présence d'une lipase liposoluble*, relativement faible cependant par rapport à celle du *Mycobacterium phleï* même, nous avons jugé nécessaire de rechercher la cause de cette faible concentration de l'enzyme dans l'huile.

CHAPITRE IV

ESSAI D'ISOLEMENT ET DE PURIFICATION DES LIPASES HYDROSOLUBLES

Après avoir constaté qu'une grande partie des lipases de *Mycobacterium phleï* était insoluble dans l'huile, *nous avons supposé qu'il doit exister des lipases endocellulaires hydrosolubles.* Pour déceler ces enzymes et les doser, nous avons eu recours aux méthodes employées par Villiger qui travaillait en même temps que nous dans le *Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg.*

Villiger a constaté qu'il y a un rapport direct entre le taux de protéines et le taux de lipases; d'autre part, il a réussi à extraire ces enzymes par *chromatographie sur une colonne de cellulose DEAE (diéthyl-amino-éthyl-cellulose)* employée pour la première fois par Sober et Peterson pour l'isolement de transminase. Il a examiné un certain nombre de solutions tampon pour étudier leurs propriétés de dissolution, d'absorption et d'élution des lipases. Il a ainsi pu constater qu'un tampon phosphaté de pH = 6,8 et 0,2 molaire se prêtait le mieux à la chromatographie en colonne au moyen de la *cellulose DEAE* et à l'élution ultérieure des lipases. Nous avons donc eu recours à ce réactif, préparé de la façon suivante :

Solution de Phosphate disodique :

$Na^2HPO^4. 2 H^2 O$	11,876 g
Eau bidistillée q.s.p.	1 000,0 cc

Solution de phosphate monopotassique :

KH^2PO^4	9,078 g
Eau bidistillée q.s.p.	1 000,0 cc

Pour préparer la solution tampon de pH = 6,8, on mélange :

Solution 1	50 parties
Solution 2	50 parties

On ajuste la concentration ionique par rapport à une solution de HCl N/5.

Nous avons d'autre part préparé des cultures de *Mycobacterium phleï* que nous interrompons le 10e jour et dont nous séparons par centrifu-

gation la solution nutritive surnageante du résidu bactérien. La phase aqueuse ne contient pas de *lipases proprement dites*, elle n'est active que contre le *butyrate d'éthyle* et le *Tween* 20 : il s'agit par conséquent d'*estérases exocellulaires*.

Nous avons procédé au dosage de l'activité lipasique du résidu bactérien après délipoïdation, effectuée d'après les données de VILLIGER :

Nous avons employé des fractions de 20 g de résidu bactérien que nous avons traitées à froid par une solution tampon phosphatée de 0,05 mol et de pH = 7,2. On mélange pour obtenir une pâtée semi-liquide que l'on place dans un mélange refroidissant de glace concassée et de chlorure de sodium réglé à -5°. D'autre part, nous avons refroidi à -70° 500 cc d'acétone fraîchement distillé; on ajoute 5 gouttes *d'alcool n-octylique* pour éviter la formation ultérieure de mousse. La suspension bactérienne refroidie est introduite goutte à goutte dans l'acétone froid. Cette manipulation doit se faire en 10 minutes environ, pendant lesquelles on agite à l'agitateur mécanique. L'agitation est prolongée ensuite pendant une heure. On laisse reposer et l'on obtient ainsi une phase acétonique surnageante, que l'on décante dans des tubes à centrifugation préalablement refroidis. Le résidu microbien obtenu est débarrassé des traces d'acétone par filtration dans le vide. On le reprend dans très peu de solution tampon phosphaté et on y introduit 100 cc de *n-butanol* préalablement refroidi à -15°. On procède à l'extraction par agitation pendant 15 minutes en présence de quelques gouttes d'alcool octylique pour éviter la formation de mousse. Après centrifugation et décantation, on obtient une phase surnageante de butanol et le résidu microbien est encore délipoïdé au moyen de 100 cc d'acétone froid, par agitation pendant 30 minutes. Par centrifugation et décantation, on obtient une phase acétonique et un dépôt microbien qui est lavé à cinq reprises au moyen d'acétone. Finalement on centrifuge, on décante la dernière fraction d'acétone et l'on évapore les traces restantes dans le vide.

Le résidu définitivement délipoïdé est introduit dans un pèse-filtre et conservé à la glacière sur l'anhydride phosphorique.

Les différentes fractions acétoniques et butanoliques sont réunies, introduites dans des boyaux de cellulose *(Dialysing Tubing Cellulose N° 4465-A 2 with flat* 11 4 *inch., Arthur H. Thomas Company, Philadelphia, U.S.A.)* et dialysées pendant 48 heures à 4° contre 1 000 cc d'une solution tampon phosphatée de 0,5 mol et pH = 7,2, solution que nous avons renouvelée toutes les 12 heures. Le dialysat est ensuite concentré par lyophilisation jusqu'à 100 cc. Nous avons contrôlé son activité lipasique vis-à-vis de l'huile d'olive et du butyrate d'éthyle, activité qui s'est avérée plus importante pour la première, mais le taux de lipases liposolubles était assez réduit. Nous pouvons ainsi confirmer les résultats de VILLIGER, prouvant que les ions du tampon phosphaté exercent une action protectrice sur ces lipases liposolubles.

Après l'élimination des lipases liposolubles, le concentrat acétono-butanolique a été évaporé par distillation dans le vide *pour recueillir les lipides de Mycobacterium phleï.* A ce sujet, nous l'avons lavé à plusieurs reprises avec de l'eau distillée pour éliminer tous les produits hydrosolubles (sels minéraux, protéines, glucides, etc.).

Le résidu délipoïdé est emloyé pour le dosage de l'activité lipasique vis-à-vis de l'*huile d'olive, des Tweens* 80, 60 *et* 20, *du butyrate d'éthyle et des lipides tuberculeux.*

Le même processus de délipoïdation a été employé sur des cultures de *Bacilles acido-alcoolo-résistants avirulents et virulents suivants :*

SOUCHES AVIRULENTES :

Mycobacterium tuberculosis H 37 RA
BCG 847
Mycobacterium phleï

SOUCHES VIRULENTES :

Mycobacterium tuberculosis H 37 RV
Bacille tuberculeux aviaire B
Bacille tuberculeux aviaire C

Toutes ces souches sont *sensibles* à l'INH.

Dans le tableau suivant nous rapportons le taux de matériel bactérien délipoïdé et de lipides bactériens obtenus par nos techniques en partant de 20 g de poudre microbienne déshydratée :

TABLEAU N° 8

Poudre microbienne 20 g	Matériel bactérien délipoïdé	Lipides bactériens en % du poids sec des bactéries
BCG	6 — 8 g	15 %
M. phleï	7 — 9,4 g	13 %
H 37 RA	3,3 — 3,8 g	19 %
H 37 RV	2,6 — 3,1 g	17 %
B. aviaire B.....	3,7 — 4,2 g	26 %
B. aviaire C	3,9 — 4,5 g	19 %

Nous avons effectué les dosages du pouvoir lipolytique avec le matériel bactérien délipidé. Les lipases de chaque souche ont été contrôlées, comme nous l'avons déjà dit, sur les différents substrats lipidiques, par trois dosages et nous indiquons dans les tableaux qui vont suivre la moyenne résultant de ces trois valeurs.

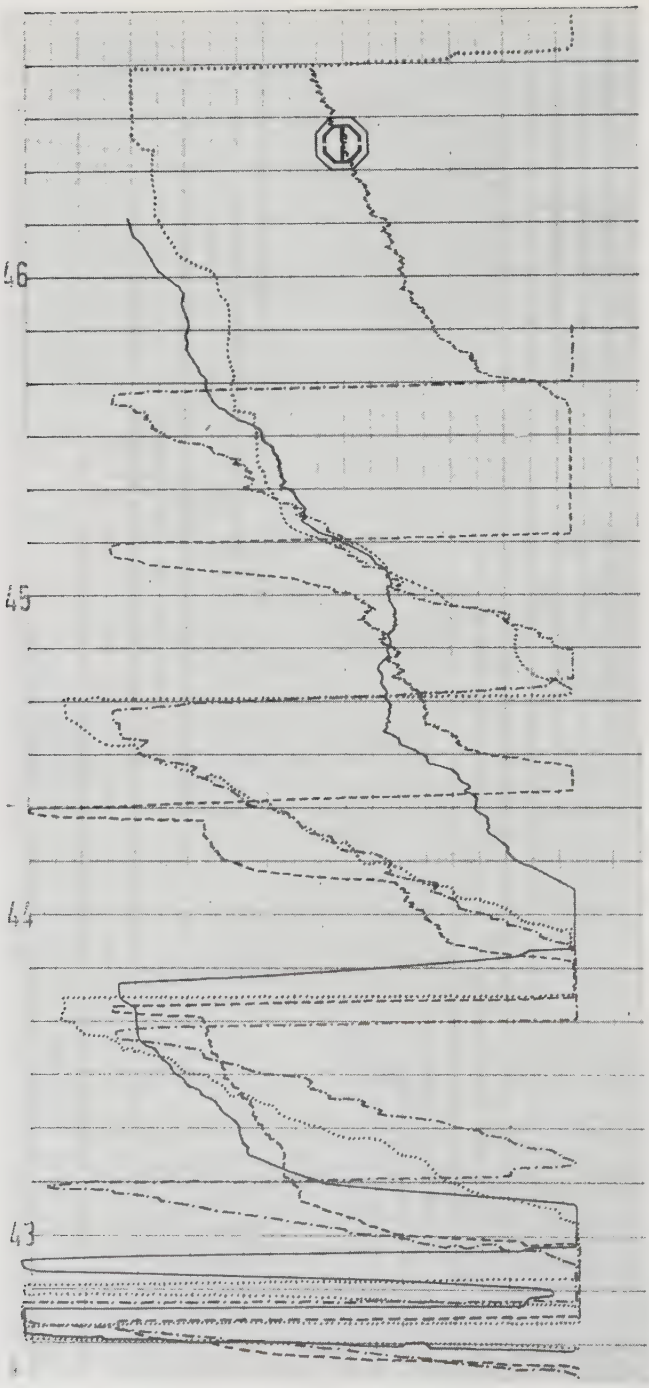


Fig. 6

a) M.phleï/Butyrate d'éthyle ——— ;

b) M. phleï/ Tween 20 ;

c) M. phleï/ Tween 60 - - - - - ;

d) M. phleï/ Tween 80 .–.–.–

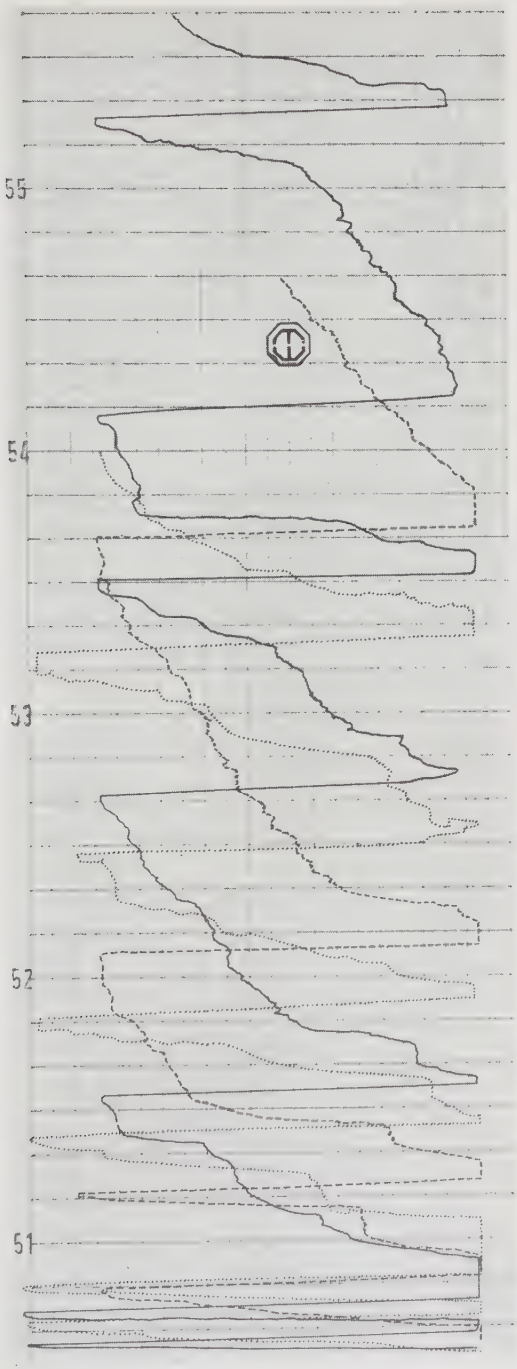


Fig. 7

a) M. phleï/huile d'olive ——— ;

b) M. phleï/lipides phleï ..... ;

c) M. phleï/lipides BCG – – – – –.

A titre documentaire nous rapportons ci-dessous sept courbes (voir fig. 6 et 7) authentiques enregistrées à l'*appareil Metrawatt* et ayant trait aux lipases de *Mycobacterium phleï* mises à l'épreuve vis-à-vis du butyrate d'éthyle, des Tweens 20, 60 et 80, de l'huile d'olive, des lipides extraits du *M. phleï* même et des lipides du Mycobacterium BCG.

Comme on le voit le taux d'acides gras dégradés par la *lipase purifiée de Mycobacterium phleï* correspond à :

52 gouttes de NaOH N/10 pour le butyrate d'éthyle, (BE)
60 » » » » pour le Tween 20, (T 20)
72 » » » » pour le Tween 60, (T 60)
85 » » » » pour le Tween 80, (T 80)
89 » » » » pour l'huile d'olive, (HO)
112 » » » » pour les lipides phléïques, (L.P)
82 » » » » pour les lipides du BCG (L.BCG)

et ceci en 30 minutes.

En ce qui concerne les lipases des *autres Mycobactéries* que nous avons étudiées, nous reproduisons les différents graphiques en des courbes sur papier millimétré en inscrivant en abscisse les minutes et en ordonnée le nombre de gouttes de NaOH N/10 nécessaires pour neutraliser les acides gras libérés. Nous avons également choisi arbitrairement des périodes de trois minutes pour ramener les courbes enregistrées par l'appareil *Metrawatt* à des courbes ininterrompues.

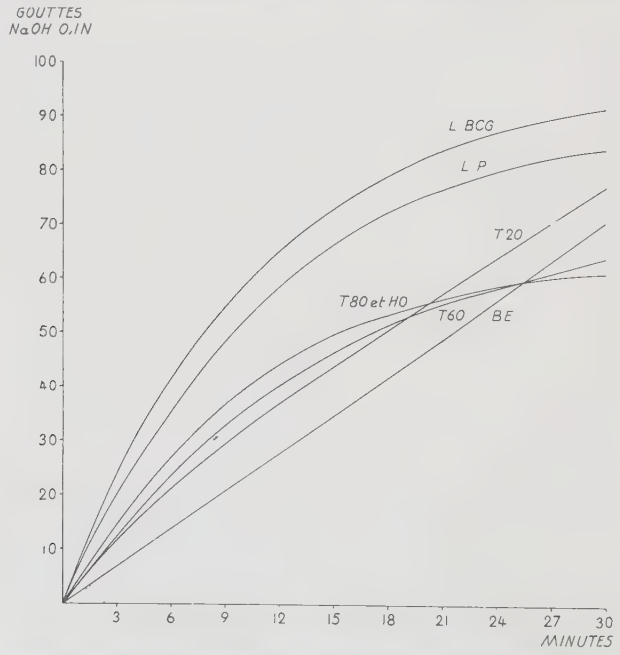


Fig. 8 - Lipases purifiées du Mycobacterium BCG éprouvés vis-à-vis des différents substrats lipidiques.

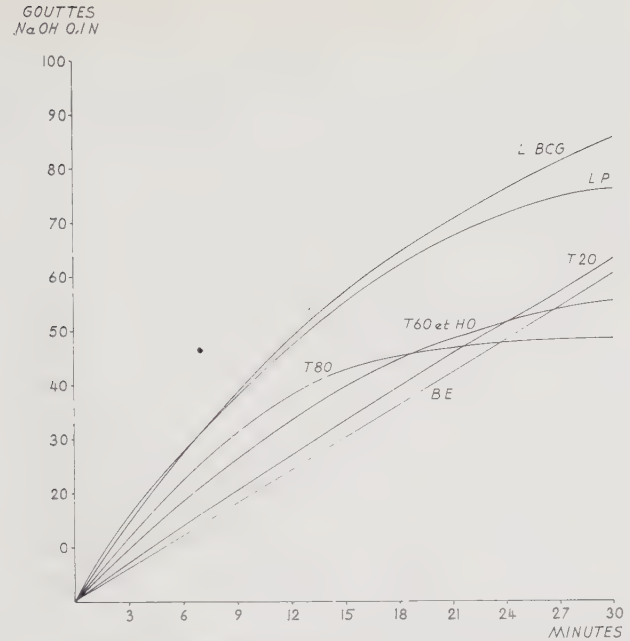


Fig. 9 - Lipases purifiées du Mycobacterium H 37Rv éprouvés vis-à-vis des différents substrats lipidiques.

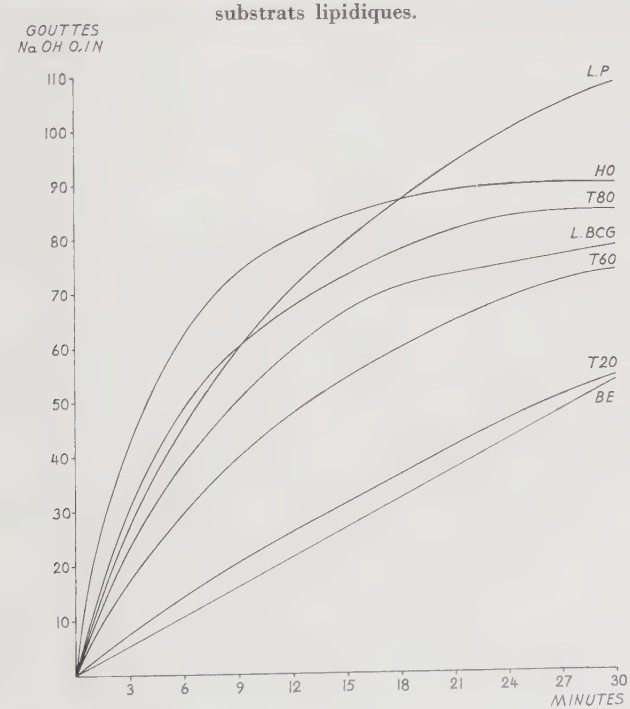


Fig. 10 - Lipases purifiées de Mycobacterium H 37 Ra éprouvés vis-à-vis des différents substrats lipidiques.

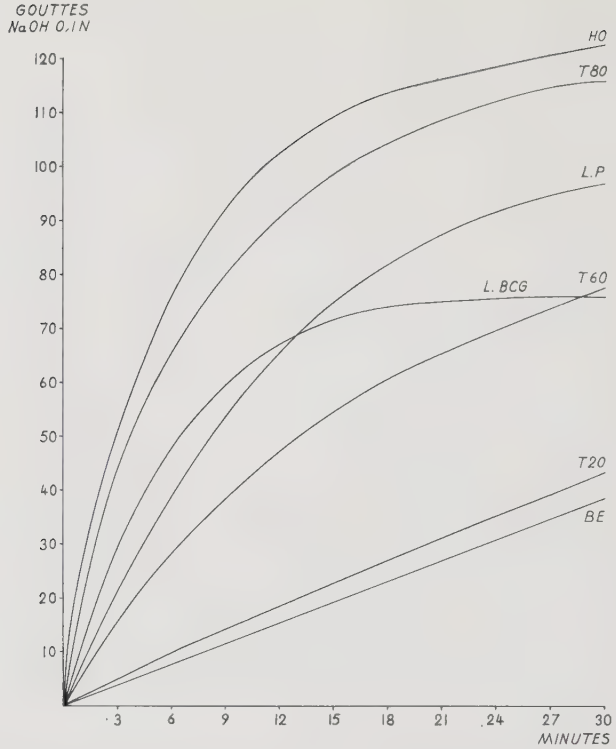


Fig. 11 - Lipases purifiées de Mycobacterium aviaire B éprouvés vis-à-vis des différents substrats lipidiques

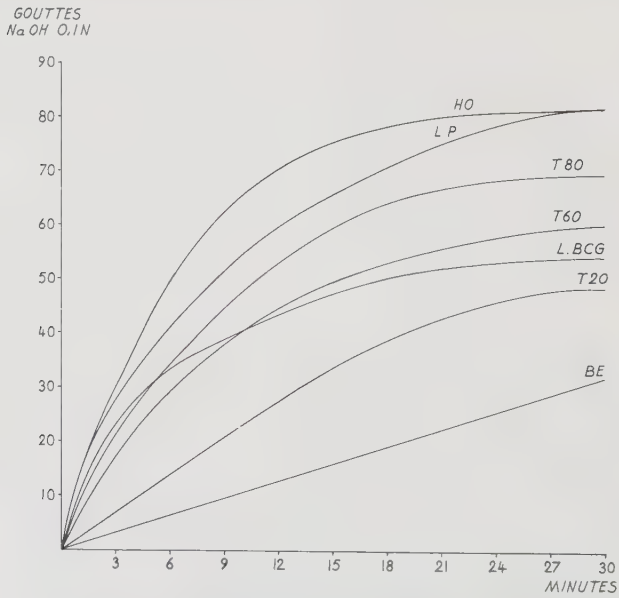


Fig. 12 - Lipases purifiées de Mycobacterium aviaire C éprouvés vis-à-vis des différents substrats lipidiques.

Nous rapportons dans les tableaux suivants les valeurs enregistrées pour chaque expérience en désignant les différents substrats lipidiques par les abréviations suivantes :

BE = butyrate d'éthyle; T 20, T 60 et T 80 = Tween 20, etc.

HO = huile d'olive; LP = lipides phléïques; LBCG = lipides du BCG.

TABLEAU N° 9

Mycobacterium BCG

Temps en minutes	NaOH N/10 gouttes						
	BE	T20	T60	T80	HO	LP	LBCG
9	21	30	33	37	37	48	54
15	35	43	46	49	50	66	74
21	48	56	55	56	57	76	83
30	70	76	64	61	60	84	91

TABLEAU N° 10

Mycobacterium tuberculosis H 37 Rv

Temps en minutes	NaOH N/10 gouttes						
	BE	T20	T60	T80	HO	LP	LBCG
9	18	21	26	32	26	38	39
15	30	34	40	43	41	56	58
21	43	47	48	47	49	68	72
30	61	64	56	49	56	76	86

TABLEAU N° 11

Mycobacterium tuberculosis H 37 Ra

Temps en minutes	NaOH N/10 gouttes						
	BE	T20	T60	T80	HO	LP	LBCG
9	17	21	40	60	74	60	50
15	28	31	54	73	84	80	67
21	38	42	64	81	89	98	73
30	53	54	74	85	90	109	78

TABLEAU N° 12

Mycobacterium tuberculosis aviaire B

Temps en minutes	NaOH N/10 gouttes						
	BE	T20	T60	T80	HO	LP	LBCG
9	11	19	38	80	92	52	60
15	19	23	54	97	107	75	71
21	27	31	65	107	115	87	75
30	38	43	77	115	121	96	75

TABLEAU N° 13

Mycobacterium tuberculosis aviaire C

Temps en minutes	NaOH N/10 gouttes						
	BE	T20	T60	T80	HO	LP	LBCG
9	9	21	38	44	62	51	39
15	16	34	49	59	75	65	47
21	22	42	56	66	79	75	52
30	32	48	60	69	81	81	54

Pour plus de clarté, nous reproduisons les valeurs finales trouvées pour chaque microorganisme mis en expérience :

TABLEAU N° 14

Nombre total de gouttes de NaOH N/10 utilisé pour chaque essai

Microorganisme	BE	T20	T60	T80	HO	LP	LBCG
M. phleï	52	60	72	85	90	112	82
BCG	70	76	64	61	60	84	91
H 37 Rv	61	64	56	49	56	76	86
H 37 Ra	53	54	74	85	90	109	78
Aviaire B	38	43	77	115	121	96	75
Aviaire C	32	48	60	69	81	81	54

Interprétation :

En considérant ces courbes, nous remarquons tout d'abord que les produits lipasiques que nous avons purifiés *forment un complexe d'estérases et de lipases.* L'action sur le butyrate d'éthyle et sur le Tween 20

résulte essentiellement de la présence des estérases; ce fait se caractérise par le tracé des courbes *qui évolue sensiblement selon une droite*, comme Christen et Krœhne l'ont déjà fait remarquer.

Pour toutes nos lipases purifiées la dégradation du butyrate d'éthyle évolue selon une droite, alors que pour le Tween 20 (acide laurique) les lipases proprement dites interviennent dans une faible proportion, puisque les courbes sont très légèrement hyperboliques. Les courbes obtenues avec les Tweens 60 et 80, l'huile d'olive et les lipides tuberculeux *donnent l'image caractéristique en hyperbole* déjà mentionnée par nos prédécesseurs. Il s'agit donc ici d'une action purement lipasique.

En ce qui concerne la lipase de *Mycobacterium phleï*, nous voyons que la dégradation des différents substrats évolue dans un ordre croissant du butyrate d'éthyle aux lipides spécifiques de M. *phleï*. Nous constatons que cette lipase est plus active vis-à-vis du Tween 80 et surtout de l'huile d'olive que sur les lipides purifiés de *Mycobacterium BCG*.

Pour la lipase de cette dernière bactérie, notre complexe enzymatique renferme beaucoup plus d'estérases que celui de *M. phleï*. Son activité lipasique vis-à-vis des Tweens 60 et 80 et de l'huile d'olive est nettement moins prononcée. Cette lipase a une action optimale vis-à-vis des lipides du BCG même, puis sur les lipides de *M. phleï ; elle est donc beaucoup plus spécifique vis-à-vis des substrats retirés des bacilles acido-alcoolo-résistants que sur les esters stéariques et oléiques.*

En ce qui concerne la lipase préparée à partir du *Bacille H 37 Rv*, nous voyons que son activité est à peu près comparable à celle du BCG. Ces lipases sont très spécifiques pour les graisses extraites des bacilles acido-alcoolo-résistants: elles sont nettement moins actives sur les Tweens et le complexe enzymatique renferme moins d'estérases que le complexe BCG. *L'optimum d'activité lipasique se manifeste vis-à-vis des lipides provenant de Mycobacterium BCG, puis de Mycobacterium phleï.*

Les extraits lipolytiques obtenus à partir de *Mycobacterium H 37 Ra* contiennent un taux de lipases plus élevé que celui d'estérases. En effet, les valeurs totales enregistrées évoluent encore dans un ordre progressivement croissant du butyrate d'éthyle à l'huile d'olive, en passant par les Tweens 20, 60 et 80, pour atteindre un maximum avec les lipides originaires de *Mycobacterium phleï*. Cette lipase est moins spécifique pour les lipides du Bacille BCG. *A ce point de vue, le complexe enzymatique de Mycobacterium H 37 Ra se rapproche beaucoup plus de celui de M. phleï que de celui de la souche virulente homologue.*

Quant aux extraits lipolytiques des deux *Mycobactéries aviaires*, nous avons constaté que le complexe enzymatique de la *souche B* renferme relativement peu d'estérases et leurs lipases sont moins spécifiques vis-à-vis des lipides extraits de *M. phleï* et BCG que vis-à-vis du Tween 80 et de l'huile d'olive. Sur cette dernière, l'activité lipolytique de la *souche aviaire B* est très prononcée et de très longue durée. Il faut insister sur le fait que ce complexe enzymatique présente beaucoup plus

d'analogies avec celui de *M. phleï* qu'avec celui du Bacille BCG. Le pouvoir lipolytique de la *souche C* s'exerce qualitativement d'une façon sensiblement analogue à celui de la *souche B*, mais quantitativement, *son action lipasique et estérasique est nettement plus faible.*

L'ensemble de ces résultats suscite quelques considérations d'ordre général :

En effet, l'acido-résistance de *M. aviaire C* est nettement plus prononcée que celle de la *souche B* et de *Mycobacterium phleï*, bien que son pouvoir lipasique soit plus réduit. Ce fait semble confirmer les observations d'Andrejew, Gernez-Rieux et Taquet (45) : « *Les bacilles tuberculeux peuvent posséder à la fois, et une forte acido-résistance et une très faible activité lipasique.* »

Par contre, nous ne pouvons pas suivre ces auteurs, quand ils affirment « *La très nette différence d'activité lipasique qui existe entre les Bacilles tuberculeux (activité très faible) et Mycobacterium phleï (activité relativement forte) peut conditionner en partie la croissance beaucoup plus lente du Bacille tuberculeux (3 à 4 semaines sur bouillon glycériné ou milieu de Sauton). par rapport à celle de Mycobacterium phleï (3 jours sur les mêmes milieux). En effet, pour produire une quantité aussi importante de graisse et même éventuellement plus importante, le Bacilles tuberculeux nécessiteraient plus de temps que Mycobacterium phleï, puisque leur activité lipasique est 10 à 20 fois plus faible* ».

Il ne nous semble pas, d'après nos expériences, qu'il existe une relation directe entre le pouvoir de lipasogenèse et la vitesse de croissance de ces germes acido-résistants, puisque les lipases de *Mycobacterium aviaire B* sont beaucoup plus actives que celles de *M. aviaire C* ou de *M. phleï*. D'autre part, il est notoire que l'acido-résistance est nettement plus développée chez des germes tels que *M. tuberculosis BCG* ou *H 37 Rv* que chez *Mycobacterium phleï et les Mycobactéries aviaires. Il ne paraît donc pas exister de rapport entre la lipasogenèse et la propriété d'acido-résistance.*

Un autre fait mérite d'être relevé : Les auteurs précités prétendent que « *l'activité lipasique est faible (et dans certains cas pratiquement nulle) chez tous les Bacilles tuberculeux typiques humains, bovins et aviaires, virulents ou avirulents. Il n'y a pratiquement pas de différence entre une souche virulente (H 37 Rv) et une souche avirulente (H 37 Ra)* ». Nous avons pu constater que la genèse des lipases est qualitativement et quantitativement plus élevée chez les bacilles acido-alcoolo-résistants pathogènes que chez les avirulents. Celle-ci ne peut être évaluée que par rapport à un grand nombre de substrats lipidiques de composition et d'origine nettement définies. Le rapport *estérases /lipases* d'une souche donnée, est variable suivant la virulence du type. Ainsi, le BCG, considéré comme avirulent, présente une analogie avec la *souche virulente H 37 Rv;* par contre, cette souche mutée en H *37* Ra *(avirulente)* transforme son matériau somatique et se rapproche de *Mycobacterium*

phleï. Il devrait donc exister une différence dans la genèse des lipases entre les souches virulentes et avirulentes atypiques. Cependant pour déterminer le pouvoir lipolytique d'une espèce bactérienne acido-alcoolo-résistante, il nous paraît indispensable d'avoir recours aux lipides homologues et les enzymes lipasiques idiogènes doivent être soigneusement purifiées et dépourvues de toute trace de lipides génériques.

On voit que le sujet de la lipasogenèse est très complexe et soulève un grand nombre de problèmes hautement intéressants, mais impossible à résoudre au moyen de cultures vivant dans un substrat en perpétuel déséquilibre métabolique et catabolique.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Poursuivant les travaux de CHRISTEN, KRŒHNE et VILLIGER sur l'*activité estérasique et lipasique des Mycobactéries virulentes et avirulentes*, nous avons tout d'abord rapporté des généralités concernant ce problème, non seulement pour les *Bactéries AAR, mais aussi pour les autres germes aérobies et anaérobies*. Dans ce chapitre, nous relatons également les différentes techniques élaborées au cours des années à partir de celles de BAMANN et MYRBÄCK et de WILLSTAETTER et MEMMEN, jusqu'aux travaux les plus récents de DESNUELLE, de PRÉVOT, de RICHOU et surtout de SIERRA et de l'*école américaine*.

Nous donnons ensuite une description détaillée de la composition et du montage de l'appareil enregistreur mis au point par J. MEYER et ses élèves pour le dosage de l'activité lipolytique.

Nous avons tout d'abord essayé d'élucider le problème de l'existence de lipases hydrosolubles dans *Mycobacterium phleï ;* nous avons eu recours à différentes techniques devant nous permettre de libérer les enzymes endocellulaires, telles que broyage, lyse par une forte concentration d'électrolytes ou de non-électrolytes, emploi de solvants organiques, et finalement attaque de la membrane cellulaire par une enzyme spéciale : la *Lysozyme*. Aucune de ces techniques ne nous a donné satisfaction.

Nous nous sommes ensuite inspiré de la technique de NICLOUX pour extraire la lipase contenue dans les graines de Ricin. Nous avons ainsi constaté que les extraits huileux sont doués d'une action lipolytique *à partir du moment où l'on y introduit des activateurs enzymatiques*.

Encouragé par ce résultat, nous avons essayé d'isoler une *lipase liposoluble*, mais nos techniques ne nous ont donné qu'un rendement peu intéressant. Nous avons vainement tenté d'y remédier en modifiant le milieu de culture et le substrat réactionnel. Nous avons ainsi pu constater qu'il y avait avantage à supprimer l'émulsion gommeuse d'huile d'olive préconisée par DESNUELLE et CHRISTEN, puisque la quantité d'huile de l'extrait enzymatique huileux est suffisante comme substrat spécifique pour les lipases à examiner. Nous avons d'autre part introduit une *solution d'oléate de sodium* dans le but de bloquer l'activité des ions Ca^{++} intervenant comme accélérateurs de la réaction enzymatique.

Pour le dosage des lipases liposolubles, nous avons employé 1 g de poudre de *Mycobacterium phleï* épuisée par l'huile d'olive et 1 g de

poudre de même origine, non traitée. La différence des deux dosages permet de conclure à une diminution de 11 % du taux de lipases dans la première poudre bactérienne. On voit ainsi que le taux de lipases liposolubles est relativement faible chez le *Mycobacterium phleï*.

Nous avons ensuite essayé de déterminer le taux de lipases par dosage de l'azote total dans nos différents extraits huileux. Nous avons eu recours à la *méthode de Kjelldahl* en employant un catalyseur à base de sulfate de potassium et de mercure, et de sélénium. Nous avons obtenu les résultats suivants : Pour l'*extrait huileux de Mycobacterium phleï entier* le taux d'azote est de 0,00182 g/cc, tandis que pour l'*extrait huileux de la bactérie lysée*, il est de 0,00163 g/cc. On voit ainsi que le dosage de l'azote confirme les résultats que nous avons obtenus au moyen de la méthode ionométrique à l'aide de l'appareil enregistreur.

Après avoir démontré que le taux de lipase liposoluble est relativement faible par rapport à l'activité enzymatique de la bactérie même, nous avons jugé nécessaire de rechercher d'éventuelles lipases hydrosolubles.

Pour déceler ces enzymes et les doser, nous avons eu recours aux méthodes de Villiger qui a constaté qu'il existe *un rapport direct entre le taux de protéines et le taux de lipases*. Nous avons employé sa méthode d'extraction, qui a recours à la *chromatographie sur colonne de cellulose DEAE* et au tampon phosphaté de pH 6,8 et 0,2 molaire. Pour l'élution des lipases nous avons employé une solution tampon phosphaté de pH 7,2 et 0,05 molaire ; l'éluat est ensuite soumis à une extraction par l'acétone, en travaillant à des températures de — 20°. On procède ensuite à une agitation mécanique pendant environ 10 minutes et on laisse reposer pour obtenir une phase acétonique surnageante et un résidu microbien. Celui-ci est ensuite épuisé au moyen de n-butanol à — 15°. Par centrifugation et décantation on obtient une phase de butanol et un *résidu microbien délipoïdé* que l'on purifie encore par un nouveau traitement à l'acétone. Les différentes fractions acétoniques et butanoliques ont été purifiées par dialyse à + 4° contre une solution tampon phosphaté de 0,5 mol et pH = 7,2. Nous avons ainsi obtenu un extrait actif contre l'huile d'olive et le butyrate d'éthyle, confirmant les données de Villiger qui a prouvé que les ions phosphatés exercent une action protectrice sur ces lipases.

Après élimination des lipases, le concentrat acétono-butanolique est évaporé par distillation dans le vide pour récolter les lipides purifiés de *Mycobacterium phleï*. La purification a été poussée plus avant par des lavages successifs à l'eau distillée pour éliminer tous les produits hydrosolubles.

Le même processus de délipoïdation a été employé sur des cultures d'*autres bacilles acido-alcoolo-résistants :*

souches avirulentes : Mycobacterium phleï
Bacille BCG de l'Institut Pasteur
Mycobacterium tuberculosis H 37 Ra

souches virulentes : Mycobacterium tuberculosis H 37 Rv
Bacille tuberculeux aviaire B
Bacille tuberculeux aviaire C

Toutes ces souches sont sensibles à l'isoniazide.

Nous avons dosé le matériel bactérien délipoïdé extrait de ces souches et avons ainsi déterminé le taux de lipides bactériens que nous exprimons en pour cent du poids sec des bactéries. Le substrat bactérien délipoïdé a été utilisé pour le dosage du pouvoir lipolytique. Chaque détermination a été faite à trois reprises, les résultats sont rapportés dans des tableaux et des courbes par la moyenne de ces trois valeurs.

Comme substrat lipidique nous avons eu recours au butyrate d'éthyle, aux Tweens 20, 60 et 80, à l'huile d'olive et aux lipides du Bacille phléique et du BCG purifiés.

Nous avons ainsi constaté que la lipase de *Mycobacterium phleï* dégrade les différents substrats lipidiques dans un ordre progressivement croissant du butyrate d'éthyle aux lipides spécifiques de la bactérie même. Quant aux complexes des autres *Mycobactéries employées*, nous avons noté que la lipase de *la souche H 37 Ra* se rapproche de celle de *Mycobacterium phleï* ainsi que de celle des souches aviaires B et C. Il faut noter que le *complexe enzymatique de la souche H 37 Rv se différencie nettement de celui de la souche homologue avirulente et a une activité lipolytique comparable à celle du complexe enzymatique du BCG.* D'autre part ces deux extraits lipolytiques contiennent beaucoup plus d'estérases que les souches avirulentes et aviaires. Ils se distinguent également par une action moindre sur les composés lipidiques hétérologues : *les Tweens supérieurs et l'huile d'olive*, mais contiennent une proportion de lipases spécifiques, tuberculeuses beaucoup plus importante.

Nous avons d'autre part constaté que les *Bacilles tuberculeux peuvent posséder à la fois une forte acido-résistance et une très faible activité lipasique.* Il ne semble pas exister de rapport entre l'activité lipolytique de ces germes et leur vitesse de croissance ; la qualité de synthèse de ces lipases semble ainsi beaucoup plus prononcée que leur pouvoir de dégradation, du moins dans nos conditions expérimentales.

De plus, *il ne paraît pas exister de rapport entre la lipasogenèse de ces germes et leur propriété d'acido-résistance.* Des souches mutées, telles que H 37 Rv et H 37 Ra, en transformant leur matériau somatique, subissent également une modification de leur potentiel enzymatique. De toute façon, pour établir une étude différentielle entre les complexes enzymatiques de ces bactéries acido-alcoolo-résistantes, *il est nécessaire de travailler avec des enzymes hautement purifiées et des lipides homologues et hétérologues extraits des différentes souches en étude.*

BIBLIOGRAPHIE

(24) Andrejew A., Gernez-Rieux Ch., Tacquet A. — Ann. Inst. Pasteur, 1960, 99, 1, 56.

(45) Andrejew A., Gernez-Rieux Ch., Tacquet A. — Ann. Inst. Pasteur, 1960, 99, 1, 59.

(27) Archibald R. M. — Journ. Biol. Chem., 1946, 165, 443.

(11) Arnold E. — *Etude différentielle de deux lipases fongiques.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1961.

(3) Bamann et Myrbäck. — *Methoden der Fermentforschung.* Thieme, Leipzig, 1941, p. 1576.

(37) Bier M. — Cité par Colowick et Kaplan : Methods in Enzymology, 1955, 1, 630.

(31) Bloch H., Matter E., Sutter E. — Am. Rev. Tuberc., 1947, 55, 540.

(42) Borgstroem. — Biochem. Biophys. Acta, 1954, 13, 149.

(25) Carrière G. — C.R. Soc. Biol., 1901, 53, 320.

(41) Christen H. U. — *Etude différentielle des estérases, des lipases liposolubles et des lipases hydrosolubles.* Thèse Doct. Pharm., Strasbourg, 1959.

(2) Clément J., Clément G. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, 923.

(36) Copenhaver J. H., Stafford R. O., Mac Shan W. H. — Arch. Biochem., 1950, 26, 260.

(33) Davis B.D., Dubos R.J. — Journ. Bactériol., 1948, 55, 11.

(40) Desnuelles, Constantin, Baldy. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, 37, 285.

(16) Eijkmann. — Centralbl. Bakt., Abt. I, Orig. 29, 841.

(18) German A. — Thèse de Sciences, Paris, 1953.

(38) Glick. — Journ. Gen. Physiol., 1938, 21, 289.

(26) Gomori G. — Proc. Soc. exp. Biol., 1945, 58, 362.

(8) Gorbach et Günthner. — *Ueber Hefelipase;* Monatschr. Chem., 1932, 61, 17.

(34) Hattori S., Oshima Y., Hagihara T., Nagata Y., Mishina J. — Kekkaku, 1955, 30, 716.

(32) Hoshishima K. — Fukushima Journ. Med. Sci., 1955, 2, 179.

(29) Kendall L., Walker A.W., Day A.A. — Journ. inf. Dis., 1914, 15, 443; 451; 455.

(12) Kirsh. — Bot. Gazette (Amer.) 1935, 97, 321. Journ. Biol. Chem., 1936, 108, 421.

(19) Knaysi. — Journ. Bact., 1941, 42, 664.

(14) Kroehne O.G. — *Les ferments lipolytiques des Mycobactéries. Leurs caractères différentiels par rapport aux lipases pancréatiques et fongiques.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1961.

(30) Lobstein. — Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1922.

(6) Marti E.F. — *Les ferments lipolytiques des Mycobactéries. Essai d'isolement et de purification des lipases bactériennes.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1953.

(5) Meyer J. — *Les ferments lipolytiques du sérum sanguin et des bacilles AAR. Leur rôle dans les processus physio-pathologiques.* Thèse Doct. Pharm. (État), Strasbourg, 1947.

(10) Michaelis et Nakahara. — Zeitschr. Immunitätsforsch., 1923, 36, 449.

(22) Neill et Fleming. — Journ. exp. Med., 1927, 45, 937 et 947.

(44) Nicloux. — Soc. Biol., 1904, 56, 840. Proc. Royal Soc. Biol., 1906, 70, 452.

35) Prina C. — Boll. Ist. Sieroter. milan., 1953, 32, 40.

(13) Richou R., Quinchon, Richou H., — Revue d'Immunologie, 1960, 24, 4, 505.

(20) Rosenfeld W.D. — Journ. Bact., 1947, 54, 664.

(21) Rosenfeld W.D., Zobell Cl. — Journ. Bact., 1946, 51, 600.

(1) Schaer R. — *Les ferments lipolytiques des Mycobactériacées. Leur rôle dans la croissance et le métabolisme de ces germes.* Thèse Doct. Pharm. Strasbourg, 1953.

(39) Schwert, Neurath, Kaufman et Snoke. — Journ. Biol. Chem., 1948, 172, 221.

(15) Sebald et Prévot. — Ann. Inst. Pasteur, 1960, 99, 3, 387.

(23) Sierra. — Antonie van Leeuwenhoeck Journ. Microbiol. and Serology, 1957, 23, 15.

(17) Sohngen. — Cité par Weinberg, Nativelle et Prévot : *Les microbes anaérobies*, Masson, Paris, 1937, 72.

(43) Vendrely R., Palmade C., Vendrely C. — Nature, 1956, 178, 1044.

(7) Villiger P. — *Contribution à l'étude des lipases de Mycobacterium tuberculosis. Isolement et purification.* Thèse Doct. Pharm., Strasbourg, 1961.

(28) Wells M.G., Corper H. J. — Journ. inf. Dis., 1912, 11, 388.

(9) Willstaetter et Kumagawa. — Hoppe Seylers Zeitschr. phys. Chem., 1933, 219, 1.

(4) Willstaetter et Memmen. — Hoppe Seylers Zeitschr. phys. Chem., 1923, 129, 1; 1924, 133, 229; 1924, 138, 216.

Vu, Strasbourg, le 27 janvier 1962

Le Président du Jury,

R. SARTORY

Vu et approuvé :

Strasbourg, le 2 février 1962

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,

Pour le Doyen :

L'Assesseur

G. GAZET DU CHATELIER

Vu et permis d'imprimer :

Strasbourg, le 3 février 1962

Le Recteur de l'Académie

Président du Conseil de l'Université

J. F. ANGELLOZ

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 5
PLAN DE TRAVAIL 7

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE I

Le pouvoir lipolytique chez les bactéries 9
Préparation de l'émulsion 13
Mesure de l'activité lipasique selon la technique de Desnuelle 14

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE II

Description et montage des appareils 17
Réactifs 17
Description de l'appareillage 18
Exécution des mesures 21
Dispositif de chauffage 24
Mise en marche des différents appareils 27

CHAPITRE III

Essais préliminaires 31
Quelques considérations quantitatives sur la lipase liposoluble 39

CHAPITRE IV

Essai d'isolement et de purification des lipases hydrosolubles 43
Interprétation 52

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 57
BIBLIOGRAPHIE 61

Imprimerie des Dernières Nouvelles de Strasbourg - Dépôt légal N° 2037/1962